

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 29 Número 1 (2012)

SEMESTRAL

INDEX

Editorial. Improvements in the *Revista de Toxicología*.

Monograph on Veterinary Toxicology.

Molina AM, Blanco A and Moyano MR. **Modification of histopathological and immunohistochemical biomarkers in the muscle fibers of swine after clenbuterol exposure.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 3-9

Gómez-Ramírez P, Martínez-López E, Navas I, María-Mojica P and García-Fernández AJ. **A modification of QuEChERS method to analyse anticoagulant rodenticides using small blood samples.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 10-14

Ruiz-Suárez N, Boada LD, Henríquez-Hernández LA, Almeida González M, Calabuig P, Estévez-López D, Zumbado M, Rodríguez-Hernández A, Camacho M and Luzardo OP. **Presencia de rodenticidas anticoagulantes residuos in five predatory birds species of the Canary Islands, 2002-2011.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 15-19

Sánchez-Barbudo IS, Camarero PR and Mateo R. **Intentional and accidental poisoning of wild and domestic animals in Spain: differences between regions.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 20-28

Novoa MC, Melgar MJ, García MA, Alonso J and Pérez-López M. **Analysis of the casuistry of the Service of Veterinary Toxicology (SATVe) in the period 2001-2007.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 29-35

Soler Rodríguez F, Hernández Moreno D, Oropesa Jiménez AL and Pérez López M. **Risks of mining residues: intentional inorganic arsenic poisoning in cattle.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 36-39

Buronfosse-Roque F, Hercberg-Rebelle B, Queffélec S, Pérez-López M and Pineau X. **Possible treatment of macrocyclic lactone poisoning in pets with intravenous lipids.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 40-44

Camacho M, Luzardo OP, Orós J, Calabuig P, Zumbado M, Pinós J, Almeida González M, Ruiz-Suárez N, Rodríguez-Hernández A, Sangil-Monroy M, Henríquez-Hernández LA and Boada LD. **Plasma levels of persistent organic pollutants in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 45-50

Proceedings of the Workshop on Education in Toxicology 2012. Rev. Toxicol. (2012) 29: 51-72

Book reviews. Rev. Toxicol. (2012) 29: 73

ÍNDICE

Editorial. Mejoras en la *Revista de Toxicología*.

Monografía de Toxicología Veterinaria.

Molina AM, Blanco A y Moyano MR. **Modificación de biomarcadores histopatológicos e inmunohistoquímicos en las fibras musculares de cerdos tratados con clenbuterol.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 3-9

Gómez-Ramírez P, Martínez-López E, Navas I, María-Mojica P and García-Fernández AJ. **A modification of QuEChERS method to analyse anticoagulant rodenticides using small blood samples.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 10-14

Ruiz-Suárez N, Boada LD, Henríquez-Hernández LA, Almeida González M, Calabuig P, Estévez-López D, Zumbado M, Rodríguez-Hernández A, Camacho M y Luzardo OP. **Presencia de rodenticidas anticoagulantes en cinco especies de aves rapaces de las Islas Canarias, 2003-2011.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 15-19

Sánchez-Barbudo IS, Camarero PR y Mateo R. **Intoxicaciones intencionadas y accidentales de fauna silvestre y doméstica en España: diferencias entre Comunidades Autónomas.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 20-28

Novoa MC, Melgar MJ, García MA, Alonso J y Pérez-López M. **Análisis de la casuística del Servicio de Atención Toxicológica Veterinaria (SATVe) en el periodo 2001-2007.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 29-35

Soler Rodríguez F, Hernández Moreno D, Oropesa Jiménez AL y Pérez López M. **Riesgos de los residuos de minería: intoxicación intencional en vacuno por arsénico inorgánico.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 36-39

Buronfosse-Roque F, Hercberg-Rebelle B, Queffélec S, Pérez-López M y Pineau X. **Posible tratamiento con lípidos intravenosos de carnívoros domésticos intoxicados con lactonas macrocíclicas.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 40-44

Camacho M, Luzardo OP, Orós J, Calabuig P, Zumbado M, Pinós J, Almeida González M, Ruiz-Suárez N, Rodríguez-Hernández A, Sangil-Monroy M, Henríquez-Hernández LA y Boada LD. **Contaminantes orgánicos persistentes en plasma de tortugas bobas (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 45-50

Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología 2012. Rev. Toxicol. (2012) 29: 51-72

Revisión de libros. Rev. Toxicol. (2012) 29: 73

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, e-revis@s, IBECs, ICYT, IME, EMBASE/*Excerpta Medica* y *Chemical Abstracts*
Indexed in Scopus, Latindex, REDALYC, e-revis@s, IBECs, ICYT, IME, EMBASE/*Excerpta Medica* and *Chemical Abstracts*



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 29 (1) 1-74 2012
ISSN 0212-7113

e-revist@s

<http://aetox.es>

La **Revista de Toxicología** pretende ofrecer a sus lectores (científicos, docentes, profesionales y estudiosos) información actualizada sobre los avances más recientes en Toxicología. Dedicamos especial atención a los estudios relacionados con los efectos de las sustancias químicas y los mecanismos de toxicidad, mediante ensayos en animales de experimentación, métodos alternativos in vitro y estudios en humanos. También incluye estudios sobre nuevas sustancias y técnicas analíticas. Otro aspecto importante de la revista son los artículos de revisión, especialmente en temas de Toxicología Fundamental, Toxicología Clínica, Genotoxicología, Toxicología Ambiental, etc.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Resumen actual de características y normativas

El objetivo fundamental de la Asociación Española de Toxicología es el de propiciar la relación y cooperación entre sus miembros, y coordinar sus esfuerzos a fin de contribuir al desarrollo y difusión de los conocimientos en las diferentes áreas de la toxicología. Su Estatuto fundacional fue aprobado oficialmente el 15 de enero de 1980.

Toda persona interesada en pertenecer a esta Asociación deberá cumplimentar una ficha de inscripción, refrendada por la Junta Directiva. La cuota anual (60 €) se abona por domiciliación bancaria. Esta cuota da derecho a la recepción de la "Revista de Toxicología". Una vez admitidos los nuevos asociados recibirán un título y, periódicamente, las actas de las reuniones y comunicación de actividades con carácter nacional e internacional que pueden ser de interés.

La asociación promueve la celebración, cada dos años, del Congreso Español de Toxicología, cuya organización puede delegar. Además se ha establecido la celebración periódica de seminarios o mesas redondas organizados por grupos de trabajo. Cada reunión de este tipo será monotemática y abierta a personas no pertenecientes a la Asociación, y se desarrollará en diferentes ciudades españolas.

La Asociación organiza también programas de control de calidad en Toxicología Analítica.

Asociación Española de Toxicología

Secretaría de la AETOX
Dpto. de Toxicología y Farmacología
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
28040 MADRID
e-mail: arantxam@vet.ucm.es

Copyright

El envío de un manuscrito implica: que no ha sido publicado anteriormente (excepto como abstract, o como parte de una conferencia, revisión tesis); que no está considerándose su publicación en otra revista, libro, etc.; que su publicación ha sido aprobada por todos los coautores, si los hay; que, cuando y si el manuscrito es aceptado para su publicación, los autores están de acuerdo en la cesión automática del Copyright a la editorial y que el manuscrito no será publicado en ninguna otra parte ni en ningún otro idioma sin permiso de la editorial.

Todos los artículos publicados en esta revista están protegidos por Copyright, que cubre los derechos exclusivos de reproducción y distribución del artículo (p. ej. como separatas) y también los derechos de traducción. Ningún contenido de la revista puede ser reproducido, fotocopiado, microfilmado o almacenado en bases de datos electrónicas, videodiscos, etc., sin el permiso escrito de los titulares del Copyright.

El uso de nombres descriptivos, de marcas, marcas registradas, etc., incluso si no se identifican especialmente, no implica que estos nombres no estén protegidos por las leyes y regulaciones correspondientes.

Aunque la información en esta revista se considera exacta y verdadera en la fecha de publicación, ni la editorial, ni el director de la revista, ni los autores pueden aceptar ninguna responsabilidad legal por errores u omisiones que puedan acaecer.

Los manuscritos se enviarán a través de la dirección:
<http://ojs.easyapps.es/index.php/revtoxicol>

Para otras cuestiones puede contactarse con:
Prof. Guillermo Repetto. Editor de la Revista de Toxicología.
Universidad Pablo de Olavide.
Dpto. Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica.
Ctra. de Utrera, km. 1. 41013 - Sevilla, España.
E-mail: revista/aetox.es

D.L.: CO-723-83.
S.V.: 91051 R.
ISSN: 0212-7113

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Volumen 29 Número 1 (2012)

SEMESTRAL

INDEX

Editorial. Improvements in the *Revista de Toxicología*.

Monograph on Veterinary Toxicology.

Molina AM, Blanco A and Moyano MR. **Modification of histopathological and immunohistochemical biomarkers in the muscle fibers of swine after clenbuterol exposure.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 3-9

Gómez-Ramírez P, Martínez-López E, Navas I, María-Mojica P and García-Fernández AJ. **A modification of QuEChERS method to analyse anticoagulant rodenticides using small blood samples.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 10-14

Ruiz-Suárez N, Boada LD, Henríquez-Hernández LA, Almeida González M, Calabuig P, Estévez-López D, Zumbado M, Rodríguez-Hernández A, Camacho M and Luzardo OP. **Presence of anticoagulant rodenticide residues in five predatory birds species of the Canary Islands, 2002-2011.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 15-19

Sánchez-Barbudo IS, Camarero PR and Mateo R. **Intentional and accidental poisoning of wild and domestic animals in Spain: differences between regions.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 20-28

Novoa MC, Melgar MJ, García MA, Alonso J and Pérez-López M. **Analysis of the casuistry of the Service of Veterinary Toxicology (SATVe) in the period 2001-2007.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 29-35

Soler Rodríguez F, Hernández Moreno D, Oropesa Jiménez AL and Pérez López M. **Risks of mining residues: intentional inorganic arsenic poisoning in cattle.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 36-39

Buronfosse-Roque F, Herberg-Rebelle B, Queffélec S, Pérez-López M and Pineau X. **Possible treatment of macrocyclic lactone poisoning in pets with intravenous lipids.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 40-44

Camacho M, Luzardo OP, Orós J, Calabuig P, Zumbado M, Pinós J, Almeida González M, Ruiz-Suárez N, Rodríguez-Hernández A, Sangil-Monroy M, Henríquez-Hernández LA and Boada LD. **Plasma levels of persistent organic pollutants in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 45-50

Proceedings of the Workshop on Education in Toxicology 2012. Rev. Toxicol. (2012) 29: 51-72

Book reviews. Rev. Toxicol. (2012) 29: 73

ÍNDICE

Editorial. Mejoras en la *Revista de Toxicología*.

Monografía de Toxicología Veterinaria.

Molina AM, Blanco A y Moyano MR. **Modificación de biomarcadores histopatológicos e inmunohistoquímicos en las fibras musculares de cerdos tratados con clenbuterol.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 3-9

Gómez-Ramírez P, Martínez-López E, Navas I, María-Mojica P and García-Fernández AJ. **A modification of QuEChERS method to analyse anticoagulant rodenticides using small blood samples.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 10-14

Ruiz-Suárez N, Boada LD, Henríquez-Hernández LA, Almeida González M, Calabuig P, Estévez-López D, Zumbado M, Rodríguez-Hernández A, Camacho M y Luzardo OP. **Presencia de rodenticidas anticoagulantes en cinco especies de aves rapaces de las Islas Canarias, 2003-2011.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 15-19

Sánchez-Barbudo IS, Camarero PR y Mateo R. **Intoxicaciones intencionadas y accidentales de fauna silvestre y doméstica en España: diferencias entre Comunidades Autónomas.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 20-28

Novoa MC, Melgar MJ, García MA, Alonso J y Pérez-López M. **Análisis de la casuística del Servicio de Atención Toxicológica Veterinaria (SATVe) en el período 2001-2007.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 29-35

Soler Rodríguez F, Hernández Moreno D, Oropesa Jiménez AL y Pérez López M. **Riesgos de los residuos de minería: intoxicación intencional en vacuno por arsénico inorgánico.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 36-39

Buronfosse-Roque F, Herberg-Rebelle B, Queffélec S, Pérez-López M y Pineau X. **Posible tratamiento con lípidos intravenosos de carnívoros domésticos intoxicados con lactonas macrocíclicas.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 40-44

Camacho M, Luzardo OP, Orós J, Calabuig P, Zumbado M, Pinós J, Almeida González M, Ruiz-Suárez N, Rodríguez-Hernández A, Sangil-Monroy M, Henríquez-Hernández LA y Boada LD. **Contaminantes orgánicos persistentes en plasma de tortugas bobas (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias.** Rev. Toxicol. (2012) 29: 45-50

Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología 2012. Rev. Toxicol. (2012) 29: 51-72

Revisión de libros. Rev. Toxicol. (2012) 29: 73

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, e-revis@s, IBECs, ICYT, IME, EMBASE/*Excerpta Medica* y *Chemical Abstracts*
Indexed in Scopus, Latindex, REDALYC, e-revis@s, IBECs, ICYT, IME, EMBASE/*Excerpta Medica* and *Chemical Abstracts*



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA
Rev. Toxicol. 29 (1) 1-74 2012
ISSN 0212-7113

e-revist@s

<http://aetox.es>

Revista de

Toxicología

ÓRGANO OFICIAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

COMITÉ DE REDACCIÓN

Editor

Dr. GUILLERMO REPETTO KUHN
Universidad Pablo de Olavide. SEVILLA
E-mail: grepkuh@upo.es

Editoras Adjuntas

Dra. M^a DEL PRADO MÍGUEZ SANTIYÁN
Universidad de Extremadura. CÁCERES
E-mail: prado.miguez@gmail.com

Dra. M^a JOSÉ GONZÁLEZ MUÑOZ
Universidad de Alcalá. MADRID
E-mail: mariajose.gonzalez@uah.es

Comité Editorial

Dr. RAFAEL BALAÑA FAUCE
Universidad de León. LEÓN
E-mail: rbalf@unileon.es

Dra. ANA BERMEJO BARRERA
Universidad de Santiago de Compostela. LA CORUÑA
E-mail: apimlana@usc.es

Dr. ANGEL TOMÁS CAMACHO GARCÍA
Laboratorios Lema & Bandín. VIGO
E-mail: atcamacho@lemabandin.com

Dr. DARÍO CÓRDOBA PALACIO
MEDELLÍN (COLOMBIA)

Dra. GUILLERMINA FONT PÉREZ
Universidad de Valencia. VALENCIA
E-mail: font@uv.es

Dr. ANTONIO JUAN GARCÍA FERNÁNDEZ
Universidad de Murcia. MURCIA
E-mail: ajgf@um.es

Dr. DIEGO GONZÁLEZ MACHÍN
CEPIS/OPS. LIMA (PERÚ)
E-mail: dgonzale@cepis.ops-oms.org

Dr. CARLOS GOTELLI
Centro de Investigaciones Toxicológicas
BUENOS AIRES (ARGENTINA)
E-mail: dgotelli@impsatl.com.ar

Dr. ARTURO HARDISSON DE LA TORRE
Universidad de La Laguna. TENERIFE
E-mail: atorre@ull.es

Dra. M^a ANUNCIACIÓN LAFUENTE GIMÉNEZ
Universidad de Vigo. PONTEVEDRA
E-mail: lafuente@uvigo.es

Dra. M^a ARÁNZAZU MARTÍNEZ CABALLERO
Universidad Complutense de Madrid. MADRID
E-mail: arantxam@vet.ucm.es

Dra. EMMA MARTÍNEZ LÓPEZ
Universidad de Murcia. MURCIA
E-mail: emmaml@um.es

Dra. ISABEL MORENO NAVARRO
Universidad de Sevilla. SEVILLA
E-mail: imoreno@us.es

Dra. ROSARIO MOYANO SALVAGO
Universidad de Córdoba. CÓRDOBA
E-mail: r.moyano@uco.es

Dr. JUAN CARLOS RÍOS BUSTAMANTE
Pontificia Universidad Católica. CHILE
E-mail: jcrios@MED.PUC.CL

Dr. JOSÉ RUEFF
Universidad Libre de Lisboa.
LISBOA (PORTUGAL)
E-mail: rueff.gene@fcm.unl.pt

Dra. MARÍA JOSÉ RUIZ LEAL
Universidad de Valencia. VALENCIA
E-mail: m.jose.ruiz@uv.es

Dra. MARÍA LUISA SORIA SÁNCHEZ
Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses.
SEVILLA
E-mail: luisa.soria@mju.es

EDITORIAL

Mejoras en la *Revista de Toxicología*

La *Revista de Toxicología*, órgano oficial de la Asociación Española de Toxicología, publicada desde 1983, dispone de un **nuevo sitio en Internet** en la dirección <http://ojs.easyapps.es/index.php/revtoxicol/>. Se trata de un nuevo paso en la política de acceso abierto, que es uno de los principales catalizadores de la visibilidad de las revistas. En los últimos meses se ha ido realizando el volcado individual de los artículos previamente publicados, lo que está facilitando en gran medida su localización tanto a partir del sitio web como a través de buscadores generales. Como consecuencia de gran importancia para nuestra revista, se está incrementando su visibilidad y el impacto de los artículos publicados. Animamos a que investiguen el ágil sistema de búsqueda, ya que de seguro descubrirán artículos de gran interés.

El presente número de la *Revista de Toxicología* es el primero de la misma que ha sido gestionado gracias a al nuevo sistema Open Access a partir de la citada dirección. Ha precisado de un gran número de cambios a las características propias de la revista y de la realización de diferentes tipos de pruebas. En este sentido queremos agradecer a autores, revisores y al Dr. Oscar Herrero por habernos ayudado en este proceso de adaptación y optimización del sistema, que ha ralentizado inicialmente el proceso de revisión y publicación. Una vez incluidos los manuscritos en el sistema los editores realizamos la asignación de al menos dos revisores para cada manuscrito, seleccionados de acuerdo al área toxicológica específica del mismo. El sistema recuerda periódicamente a los revisores la petición de revisión, la cual realizan mediante el mismo acceso informático. Una vez concluidas las revisiones, los editores transmitimos a los autores las consideraciones planteadas en forma anónima por los revisores y, en su caso, solicitamos una versión revisada del manuscrito. Cuando los autores insertan la nueva versión, el proceso se inicia de nuevo hasta que se produce la decisión definitiva. Se trata sin duda de una gran mejora que simplifica el contacto con los revisores y autores y el seguimiento de las numerosas versiones que se generan a partir del manuscrito inicial.

Por otra parte también queremos llamar la atención en que algunos artículos se publican en inglés. Aunque no deseamos que la revista cambie totalmente de idioma de publicación, entendemos que es una acertada decisión de la Asociación Española de Toxicología que coexistan artículos en español e inglés, lo que puede ayudar a aumentar la visibilidad de los artículos publicados en la misma.

Desde el punto de vista editorial y para tratar de contribuir con el objetivo de incrementar el factor de impacto de nuestra revista, nos permitimos solicitar que se citen artículos de la *Revista de Toxicología* siempre que se realicen publicaciones de cualquier tipo.

En relación al contenido, este número se configura básicamente como una **Monografía en Toxicología Veterinaria**. Se trata de una nueva iniciativa de la Asociación Española de Toxicología enfocada a promover el desarrollo y difusión de investigaciones en las diversas áreas toxicológicas a través de sus secciones específicas, que se inicia, en este caso, con la sección de Toxicología Veterinaria, coordinada por el Prof. Antonio Juan García Fernández. La temática de los artículos es muy variada y complementaria. Se incluyen, por ejemplo, revisiones de intoxicaciones en fauna silvestre, aves y animales domésticos. Mientras que unos artículos se centran en aspectos de analítica toxicológica, otros contemplan aspectos clínicos o de mejoras en los protocolos del tratamiento de intoxicaciones y otros son estudios experimentales. No se pueden olvidar los estudios de monitorización ambiental, que

completan así una visión general de las principales áreas de trabajo e investigación en toxicología veterinaria.

Además se incluyen las **Actas de las Jornadas de Formación en Toxicología 2012**, que organizó el equipo de la Profa. Guillermina Font en la Universidad de Valencia. El número (63) y calidad de las comunicaciones reflejan el gran interés de AETOX en promover la investigación y las mejoras en la docencia, así como la adaptación adecuada de las asignaturas de Toxicología ante los retos y oportunidades que supone el Espacio Europeo de Educación Superior.

Por último, consideramos que la revista debe contribuir a la difusión de obras de interés toxicológico, por lo que se realiza además la **revisión de dos libros de temáticas toxicológicas**.

Deseamos sean útiles y que disfruten de la lectura de los trabajos, animando al envío de manuscritos de calidad para su publicación.

Editor:

Guillermo Repetto Kuhn. Universidad Pablo de Olavide.

Editoras adjuntas:

María del Prado Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura

María José González Muñoz. Universidad de Alcalá

Monografía de Toxicología Veterinaria

Sección de Toxicología Veterinaria, Asociación Española de Toxicología, coordinada por el Prof. Antonio Juan García Fernández.

Modificación de biomarcadores histopatológicos e inmunohistoquímicos en las fibras musculares de cerdos tratados con clenbuterol

Molina AM¹, Blanco A² y Moyano MR^{1*}

¹Dpto. Farmacología, Toxicología, y Medicina legal y Forense. Universidad de Córdoba. ²Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Universidad de Córdoba

Recibido 4 de mayo de 2012 / Aceptado 27 de noviembre de 2012

Resumen: El clenbuterol frecuentemente se ha utilizado de forma ilícita en el engorde del ganado, suponiendo ello un riesgo para la salud pública. La actual normativa prohíbe por tanto su uso en la cría del ganado. En este estudio se utilizaron 14 cerdos distribuidos al azar en dos grupos de estudio (n=7), uno control, y otro expuesto a 1 mg/kg de clenbuterol durante tres meses. Se utilizó el músculo *longissimus lumbaris* para la determinación de la concentración de clenbuterol, así como para la evaluación de los parámetros inmunohistoquímicos y el análisis estructural y ultraestructural de las fibras. El estudio de los distintos biomarcadores histopatológicos e inmunohistoquímicos de las fibras musculares, tras la exposición de los animales al clenbuterol, indicó la presencia de hipertrofia muscular, miofibrosis y degeneración zenkeriana, observada tanto por microscopía óptica como electrónica. Mediante la técnica miosina ATP-asa se identificó un tipo de fibra denominada alterada en el grupo tratado que no apareció en el grupo control. Por tanto, se comprueba que el músculo *longissimus lumbaris* resulta una buena matriz para la investigación de la exposición a largo plazo a este compuesto en cerdos.

Palabras clave: clenbuterol, cerdo, biomarcador, músculo, *longissimus lumbaris*

Abstract: Modification of histopathological and immunohistochemical biomarkers in the muscle fibers of swine after clenbuterol exposure. Clenbuterol has been frequently used illicitly, causing a risk to public health; the current regulation prohibits its use to put on weight the animals. In our study we have used 14 swines randomly distributed into two groups (n=7): one control group, and another group exposed to 1 mg/kg of clenbuterol during three months. The muscle selected for the research was *longissimus lumbaris* and it was used for the determination of the concentration of clenbuterol, as well as for the evaluation of the immunohistochemical parameters, and the structural and ultrastructural analysis of the fibers. The study of the different histopathological and immunohistochemical biomarkers of the muscular fibers, after clenbuterol exposure, indicated the presence of muscular hypertrophy, myolysis, and zenkerian degeneration, observed at optic and electronic microscopy. By the use of the miosin ATP-ase technique, it was identified a fiber type denominated altered in the treated group that did not appeared in the control group. Therefore, it was verified that the muscle *longissimus lumbaris* is a good matrix for the investigation of the long-term exposure to this

clenbuterol in swines.

Key words: clenbuterol, swine, biomarker, muscle, *longissimus lumbaris*

Introducción

El uso en producción animal de sustancias promotoras del crecimiento permite una mejora sensible de varios parámetros zootécnicos [1]. Los anabolizantes generan un claro beneficio sobre todo durante el periodo en que la curva de crecimiento está produciendo preferentemente masa muscular, ejerciendo sus propiedades anabolizantes en el tejido muscular, mientras que sobre el tejido adiposo realiza una acción marcadamente catabólica [2]. Sin embargo, el uso sin control de estos compuestos ha provocado que se hayan puesto a la venta productos que contenían sustancias muy activas farmacológicamente, y que han llegado a convertirse en un serio riesgo para la salud pública. La preocupación por el hecho de que residuos de estas sustancias se introdujeran en la cadena alimenticia, además de las implicaciones éticas que conlleva el empleo de agonistas adrenérgicos sobre el bienestar animal, llevó a la Comunidad Europea a prohibir el uso del clenbuterol como agente promotor del crecimiento [3]. La actual normativa vigente [3-6] prohíbe el uso de sustancias de acción hormonal, tiroestática y β -agonista para el engorde de animales de abasto, basándose en sus efectos nocivos y el fraude que conlleva el uso de algunas de ellas, prohibiéndose consecuentemente, la comercialización de carnes que contengan residuos de dichos productos; estableciéndose los Límites Máximos de Residuos permitidos en los productos destinados al consumo, en hígado, músculo y riñón de bóvido y équido, y en la leche de bovino [7].

Los finalizadores, y en particular los β -agonistas, pueden modificar numerosos sistemas orgánicos, produciéndose en tratamientos crónicos inicialmente una hipertrofia de las fibras musculares tipo II [8,9]. Además estas fibras no sólo aumentan el número de sus núcleos, sino que también modifican su localización centralizando los componentes nucleares [9,10]. Por otra parte, se altera gravemente su actividad enzimática, como es su actividad mATPasa y la NADH-TR, por lo que se modifican los tipos de fibras musculares, e incluso se observa la aparición de un cuarto tipo de fibra de reacción inespecífica [11]. Todas estas modificaciones hacen que el músculo pueda ser utilizado como matriz de investigación en el

* e-mail: r.moyano/uco.es

análisis de biomarcadores en el estudio de la exposición al clenbuterol en cerdos.

El objetivo fundamental de este estudio, es evaluar en el músculo, como matriz para la investigación, distintos biomarcadores ante la exposición del animal al clenbuterol.

Para ello se realizará la cuantificación de clenbuterol en músculo y se evaluarán los efectos histopatológicos, inmunohistoquímicos y morfométricos de las fibras musculares.

Material y Métodos

Animales

Se utilizaron 14 cerdos “Minipig” macho de 3 meses de edad, procedentes del Servicio Centralizado de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba, donde permanecieron estabulados durante toda la experiencia, según las condiciones especificadas en las líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales (RD 1201/2005) [12]. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba. Los animales fueron alimentados una vez al día durante los tres meses de estudio (Nantaunic, Nantaporc PI®), se distribuyeron al azar a uno de los dos grupos experimentales: Grupo control (GC), (n=7), y el grupo tratado con clenbuterol (CLB) (n=7), a los que se administró diariamente una dieta conteniendo 1 mg/kg de clenbuterol (Clorhidrato de Clenbuterol, Sigma Chem Co.), mezclado con el pienso mediante dieta restringida. Tras el sacrificio, mediante aturdimiento eléctrico, se recogieron muestras del músculo *longissimus lumbaris*, para el posterior estudio histológico y toxicológico.

Cuantificación de clenbuterol

La determinación de clenbuterol se realizó siguiendo el protocolo oficial estandarizado, recomendado por la AESAN, para la determinación de residuos de sustancias beta-agonistas en tejido animal y fluidos biológicos mediante LC-MS-MS [13]. Las muestras (25 g) se homogeneizaron, recogiéndose 2,0±0,02 g de éste, se les realizó una extracción y purificación, se llevaron a sequedad en corriente de nitrógeno a 40-45°C, se reconstituyeron, centrifugaron y transfirieron a viales para su posterior cuantificación mediante LC-MS/MS, con detector triple cuadruplo 1200 (Varian), donde el flujo de la fase móvil fue de 0,4 ml/min, la Tª de la columna de 40°C (Synergi Hydro A, 150 x 2 mm, 4µ-Phenomenox), la Tª de las muestras del inyector de 15°C, el tiempo de análisis de 15 min, y el tiempo total por inyección (análisis+lavado+acondicionamiento) de 45 minutos.

Estudio estructural

Una vez extraídas las muestras se dispusieron sobre el portabloques a los que se le añadió previamente una gota de OCT-Compound. Posteriormente, se congelaron en el interior de un vaso precipitado de vidrio con 100 ml de 2-metilbutano, que había sido previamente enfriado sobre nitrógeno líquido (-190°C), y fueron almacenadas a -40°C en un recipiente de plástico. Los cortes de las muestras (n=40/muestra), de 10 µm de grosor, se realizaron con un criostato Leica CM 1850 a -20°C, y se almacenaron en cajas previamente refrigeradas a -40°C para ser posteriormente sometidas a diferentes técnicas histoquímicas. Las técnicas no enzimáticas usadas fueron la hemaoxilina-eosina, y el tricrómico de Gomori modificado por Brumback y Leech, 1987 [14].

Técnicas histoenzimológicas

Técnica miosínica (mATPasa): Las preparaciones se incubaron en una solución que contiene ATPasa y calcio a pH 9,45. Para posteriormente trasladarse a una solución de cloruro de cobalto. Por último, las muestras del tejido muscular se sometieron a una solución de sulfuro de amonio formándose sulfuro de cobalto que es insoluble y de color negro, demostrándose así la existencia mATPasa por parte de las fibras musculares. Las técnicas utilizadas en nuestro estudio son una modificación a la referida por Snow y cols. (1982) para preincubaciones alcalinas, y ácidas (Tabla 1) [15]. Las técnicas histoenzimológicas para determinar la actividad de la mATPasa, se han realizado para clasificar las fibras musculares observadas en las distintas incubaciones. En los casos en los que aparecen fibras de tinción inespecífica, es decir fibras de tinción irregular, éstas se han catalogado como fibras alteradas.

Tabla 1. Técnicas modificadas para determinación de la actividad miosínica ATPasa en las fibras musculares.

ATPasa miosínica preincubación alcalina	ATPasa miosínica preincubación ácida
Preincubación durante 15 minutos en la solución	Preincubar en la solución
Lavado con agua destilada durante 5 minutos	Lavar en solución de barbitol sódico 0,1M y cloruro de calcio 0,18M en agua destilada. pH 9,4 (ajustado con CLH 0,1 N). Durante 30 segundos.
Incubación durante 30 minutos en la solución	Incubar en la siguiente solución: solución lavadora con 15 mg de ATP. pH 9,4 (ajustado con NaOH 1M y 0,1M). Durante 45 minutos.
Lavado con cloruro de calcio 0,2M: dos baños de 5 minutos.	Cloruro de calcio al 1%: dos baños de 5 minutos.
Lavado con cloruro de cobalto al 2% durante 5 minutos.	Cloruro de cobalto al 2%: un baño de 5 minutos.
Lavado con agua destilada minuciosamente: dos baños.	Barbitol sódico 0,01M: un baño de 5-10 minutos.
Lavado con sulfuro de amonio al 1%: 1 minuto.	Agua destilada: un baño de 30 segundos.
Lavado de 2 a 5 minutos con agua destilada.	Sulfuro de amonio al 1%: un baño de 60 segundos.
Deshidratación en cadena ascendente de alcoholes con medio sintético (Eukitt).	Lavar con agua destilada: un baño de 2 a 5 minutos.
	Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes y montar en medio sintético.

Técnica para determinar el tipo de fibras: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Reduced)-Tetrazolium Reductase (NADH-TR): Incubamos en la siguiente solución (0,2 M): 10ml de Tris Buffer (pH 7,4) + 10ml de NBT + y 8ml de NADH. pH 7,2 (ajustado con ácido acético puro 1M), durante 30-60 minutos a 37°C. A continuación, se realizó un lavado con agua destilada durante un minuto, para posteriormente hacer una deshidratación en cadena de acetonas. Por último, tras un nuevo lavado con agua, se procede a montarse en glicerina y al sellado con parafina o esmalte. Las técnicas histoquímicas que hemos referido nos permitieron clasificar a las fibras según la actividad que presenta la enzima miosínica (mATPasa) frente a preincubaciones en medios alcalinos y ácidos, y en base al potencial oxidativo que exhiben actividad NADH-TR. Siguiendo los criterios establecidos previamente por otros autores [15,24,25] es posible reconocer los cuatro tipos principales de fibras.

Estudio ultraestructural

Muestras de varios milímetros fueron fijadas en glutaladehído al 2% en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,4) a 4°C durante 12 horas, y posteriormente, se refijaron en tetróxido de osmio en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,4) durante 30 minutos. Después se procedió a un lavado con solución buffer fosfato (pH 7,4) seguido de una deshidratación en escala ascendente de alcoholes para finalizar incluyéndolas en Araldita. Los cortes semifinos y ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo LKB. Los cortes semifinos se

tiñeron con azul de toluidina, mientras que en los cortes ultrafinos se realizó un doble contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes fueron observados y electrofotografiados en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10 (Philips Export BV).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico Statgraphic (Centurión XVI®), a través de diferentes pruebas estadísticas y gráficas. Para ver si existían diferencias significativas entre las medias se usó la Prueba F- en la tabla ANOVA. Las Pruebas de Múltiples Rangos se utilizaron para comprobar si las medias son significativamente diferentes unas de otras, usando el método de LSD de Fisher para discriminar entre las medias. Los resultados se expresan como media±desviación típica, y un valor de $p < 0,05$ fue considerado positivo.

Resultados

Niveles de Clenbuterol

En los animales del grupo control no se detectaron niveles de clenbuterol en las muestras de músculo, existiendo diferencias significativas $p < 0,05$, con respecto al grupo tratado ($225,077 \pm 0,23 \mu\text{g}/\text{kg}$).

Cambios estructurales

En los animales del grupo control se observó una estructura muscular normal, mientras que en el grupo de estudio que fue expuesto, si aparecieron modificaciones en su estructura. En todos los animales tratados se observó un pleomorfismo fibrilar muy marcado con una disminución evidente del tejido graso, y pérdida de tejido conectivo endomisial. En el marcado pleomorfismo destacó una importante hipertrofia fibrilar (Figura 1A-B), existiendo además algunas fibras de tamaño más pequeño.

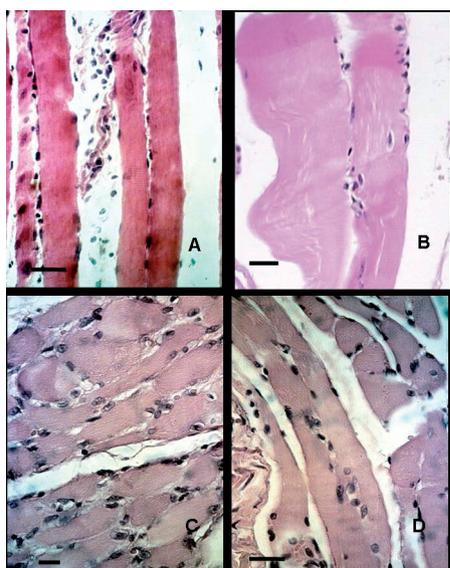


Figura 1. Microfotografía de microscopía óptica de las fibras musculares del grupo de minipig tratado con 1mg/kg de clenbuterol (hematoxilina-eosina, barra = 20 μm .). A-B. Detalle donde se observa el músculo con un marcado pleomorfismo fibrilar, hipertrofia y abundante edema. C. Fibras musculares con degeneraciones en huella dactilar y Zenkeriana. D. Destaca la centralización de los núcleos de las fibras musculares.

Se observaron alteraciones del núcleo, si bien las fibras musculares son multinucleadas y de disposición periférica, en los animales tratados aumentó sensiblemente el número de sus núcleos y además gran cantidad de estos componentes se “centralizaron” (Figura 1B-D), disponiéndose hacia el centro del sarcoplasma. La hipertrofia celular (Figura 1A) tanto en cortes transversales como longitudinales, mostró un aumento muy marcado del sarcoplasma y las miofibrillas. El material contráctil perdió su distribución longitudinal, alterándose gravemente debido a la pérdida de la relación contenido-continente. Destacó un aumento desmesurado de las miofibrillas (Figura 1A-B) que aunque mantuvo su disposición inicial, en gran número de casos este aumento miofibrilar no fue acompañado de distensiones del sarcolema, cambiando la distribución de las miofibrillas, disponiéndose las bandas del material contráctil a modo de estratos concéntricos, denominándose degeneración en “huella dactilar” (Figura 1C). Dentro de la hipertrofia fibrilar se desarrollaron unos canales internos a los que se les adosaron los núcleos, denominándose “canalización de las fibras”.

Estudios histoenzimológicos

Las fibras se disponen a modo de un mosaico en donde las fibras tipo I se asocian en un número reducido, de dos a cuatro y se disponen en el centro de una de las piezas del mosaico, en tanto que las fibras tipo IIa, que son más abundantes, rodean de forma homogénea a las fibras anteriores, y todo ello está finalmente envuelto por las fibras tipo IIb que son muy numerosas y de gran tamaño.

Tras realizar las técnicas histoenzimológicas para determinar la actividad de la mATPasa (Figura 2B), hemos clasificado las fibras musculares observadas en las distintas incubaciones (Tabla 2). Además los animales tratados con clenbuterol (Figura 2D, 2F), aparecen fibras de tinción inespecífica que se catalogaron como fibras alteradas.

Tabla 2. Clasificación de las fibras musculares de los animales control y en el grupo de exposición (CLB), mediante la técnica de detección de la actividad de la enzima mATPasa.

Grupo control		
Tipo de fibras	Tipo de tinción	Actividad mATPasa
Preincubaciones alcalinas a pH 10,3-10,4		
Tipo I	Intensa oscura	Alcalino-estable
Tipo IIa	Moderada o intermedia	Alcalino-estable
Tipo IIb	Clara	Alcalino-lábil
Preincubaciones ácidas a pH 4,6		
Tipo I	Intensa oscura	Ácido-estable
Tipo IIa	Moderada o intermedia	Ácido-estable
Tipo IIb	Clara	Ácido-lábil
Preincubaciones ácidas a pH 4,3		
Tipo I	Intensa oscura	Ácido-estable
Tipo IIa	Clara	Ácido-lábil
Grupo CLB		
Tipo de fibras	Tipo de tinción	Actividad mATPasa
Preincubaciones alcalinas pH 10,3		
Tipo I	Intensa oscura	Alcalino-estable
Tipo IIa	Moderada o intermedia	Alcalino-estable
Tipo IIb	Clara	Alcalino-lábil
Fibras alteradas	Inespecífica	
Preincubaciones ácidas a pH 4,6		
Tipo I	Intensa oscura	Ácido-estable
Tipo IIa	Moderada o intermedia	Ácido-estable
Tipo IIb	Clara	Ácido-lábil
Fibras alteradas	Inespecífica	
Preincubaciones ácidas a pH 4,3		
Tipo I	Intensa oscura	Ácido-estable
Tipo IIb	Clara	Ácido-lábil
Fibras alteradas	Inespecífica	

Con la técnica NADH-TR se detectó que la capacidad oxidativa observada en los tres tipos de fibras fue bastante elevada, demostrándose por el grado de intensidad tintorial que presentaron. Aparecieron fibras teñidas intensamente o de alta actividad oxidativa, fibras de tinción moderada o intermedia de moderada capacidad oxidativa, y fibras con baja tinción o escasa actividad oxidativa (Figura 2A-C).

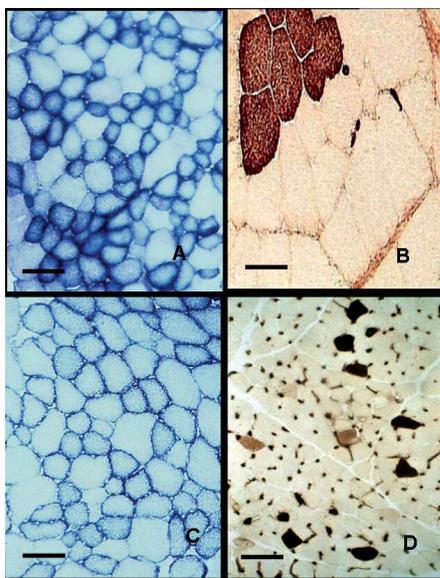


Figura 2. Microfotografía de inmunohistoquímica de las fibras musculares de minipig (grupo control, A-B y grupo tratado con clenbuterol 1 mg/kg C-D, barra = 20 µm). A. Técnica NADH-TR. Detalle de la distribución de las fibras por su capacidad oxidativa. B. Técnica mATPasa ácida, identificación de la disposición de las fibras a modo de rosetas. C. Técnica NADH-TR. Destaca la pérdida de la capacidad oxidativa de las fibras. D. Técnica mATPasa ácida. Pérdida de la distribución en mosaico de las fibras y aumento de los componentes patológicos.

Cambios ultraestructurales

Al estudio ultraestructural los animales del grupo control presentaron una imagen aparentemente normal; mientras que en los animales tratados, la alteración que definió la acción del clenbuterol sobre las fibras musculares estriadas fue la hipertrofia celular (Figura 3B,E-F), con núcleos frecuentemente centralizados. Los componentes que más destacaron fueron las miofibrillas, que se presentaron de dos formas: manteniendo el ordenamiento de las estrias transversales, con las bandas “A” e “I” coordinadas; y mostrando una desorganización entre sí de las diferentes miofibrillas. El aumento de los componentes contráctiles desequilibró la relación entre el continente y el contenido apareciendo repliegues de las miofibrillas. Estas alteraciones fueron: unifibrilar, disponiéndose a modo de anillo envolvente con un cambio en el sentido de la contracción, denominada “degeneración en anillo”; y multifibrilar, cambiando en su totalidad el sentido de su disposición y distribuyéndose a modo de estratos concéntricos, denominándose “degeneración en huella dactilar” (Figura 3A).

Junto al aumento de las miofibrillas apareció un aumento de mitocondrias que perdieron su relación con las estrias de las miofibrillas y se dispusieron en grandes acúmulos. Otros componentes alterados fueron el retículo sarcoplásmico y los túbulos “T” (Figura 3E-F).

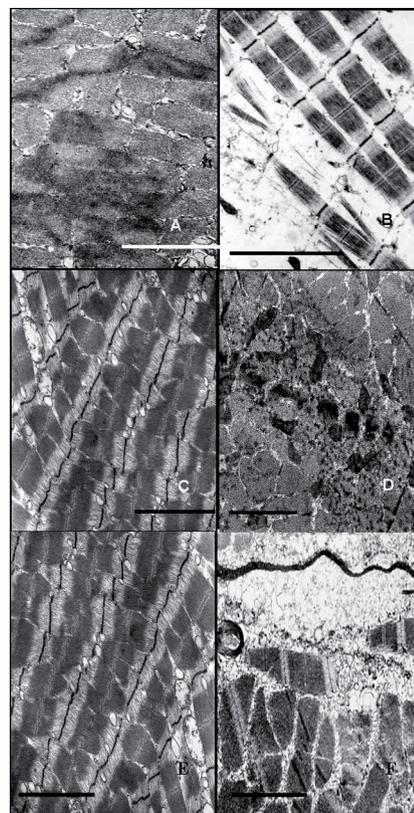


Figura 3. Microfotografía de microscopía electrónica de las fibras musculares del grupo de minipig tratado con 1 mg/kg de clenbuterol, barra = 10 µm. A. Disposición de las bandas en estratificaciones concéntricas o “degeneración en huella dactilar”. B. Detalle de una miofibrilisis. C. Hipertrofia de los miofilamentos. D. Desorganización de los componentes membranosos y miofibrilares. E. Detalle de una hipertrofia de fibras por aumento y desorganización de las miofibrillas. F. Presencia de líquidos en el sarcoplasma.

Discusión

El uso del clenbuterol como anabolizante produce una hipertrofia de carácter reversible sobre las fibras musculares [16], lo que obliga, para obtener beneficios zootécnicos, a un tratamiento continuado hasta el momento del sacrificio. Basándonos en los trabajos de otros autores [17], en este estudio hemos escogido el músculo *longissimus lumbaris*, al ser uno de los que más se hipertrofian por la acción del clenbuterol.

Al objeto de obtener unos efectos subclínicos, la dosis elegida, fue similar a la que habitualmente y de forma fraudulenta se ha empleado para el engorde del ganado, coincidiendo esta dosis con la utilizada en otros trabajos por diversos autores previamente en la misma especie [18,19], e incluso siendo esta mayor a la utilizada por otros autores [11,20].

El clenbuterol administrado se acumula en el músculo. Esto coincide con los resultados de otros autores en los que demuestran como se produce un acumulo del clenbuterol, en el músculo, aunque en pequeñas proporciones, y muestran como disminuye la concentración de éste rápidamente en los días posteriores al tratamiento llegando incluso a no ser detectables [19-21].

En nuestra experiencia hemos usado diferentes parámetros para su

estudio, como han sido fundamentalmente técnicas histoenzimológicas y los aspectos morfológicos usuales al microscopio óptico y electrónico.

Hemos observado una morfología de las fibras musculares a modo de mosaico que corresponde a una estructura normal y característica del cerdo y que se diferencia de otras especies. Donde las zonas centrales están ocupadas por varias fibras de tipo I, rodeadas a su vez por fibras del tipo IIa y en la zona más externa se localizan en las fibras tipo IIb. Las técnicas que revelan la actividad de la mATPasa en secciones transversales de músculo esquelético constituyen una herramienta muy eficaz a la hora de identificar los principales tipos de fibras [22]. Clásicamente en los músculos de los miembros y del dorso se han diferenciado tres tipos de miocitos, denominados comúnmente como fibras tipo I, IIa, IIb, y como describen otros autores [23] un cuarto tipo llamado IIx, por lo que hemos utilizado dicha metodología para la clasificación de los tipos de fibras. Desde el punto de visto zootécnico al aplicar las técnicas mATPasa [24] sobre las secciones transversales seriadas hemos comprobado que existen tres tipos de fibras principales: una de ellas corresponde con la clásica fibra de contracción lenta tipo I, mientras que las otras dos restantes son tipos o subtipos de fibras rápidas II. Dicha identificación ha sido más clara utilizando las preincubaciones a pH 10,3-10,4, como ya señalaran otros autores [25], pues a preincubaciones ácidas a pH 4,6 la diferenciación ha resultado compleja, como ya habían indicado previamente [26]. Hemos denominado a estos subtipos como fibras IIa y IIb ya que no podemos hacerlas corresponder con los tipos IIA y IIX, descritas previamente [24]. Según los criterios indicados por diferentes autores [15,24,25], las fibras tipo IIa deberían corresponder con las fibras tipo IIA, mientras que las del tipo IIalcalino-moderadas se corresponderían con las del tipo IIb propias del cerdo; sin embargo, en las preincubaciones ácidas a pH 4,6, el comportamiento tintorial de estos tipos de fibras es inverso a lo que sucede en la musculatura de los cerdos, esto podría obedecer a la presencia en las mismas de un tipo de cadena pesada de miosina (MHC) especial, diferente a las MHCIIa y MHCIIp.

En los estudios histoenzimológicos, en el grupo dosificado con clenbuterol (CLB) se identificaron los tres grupos de fibras estudiados en el grupo control (GC), como son las fibras tipo I y los subtipos IIa y IIb, aunque también se identificó un cuarto tipo de fibra que apenas mostró reacción, y en caso de presentarla, ésta fue inespecífica y correspondió a un grupo de fibras muy alteradas en el músculo estudiado. Los procesos de hipertrofia fibrilar fueron manifiestos y se presentaron en todas los tipos de fibras, aunque de manera acentuada en las del tipo inespecífico [10].

La técnica NADH-TR reveló el potencial o capacidad oxidativa de las fibras, demostrando una gran variedad o diversidad fibrilar. Aunque las fibras de tipo I ofrecieron una capacidad oxidativa alta y uniforme, las fibras tipo II mostraron mayores variaciones en la intensidad tintorial alta, moderada y baja, dependiendo del lugar donde se ubicaran. El grado de intensidad tintorial ofrecido por las fibras está relacionado con el número y tamaño de mitocondrias que contienen, lo que ha servido para establecer una clasificación fibrilar [27]. Hemos encontrado en el grupo CLB una disminución evidente de la capacidad oxidativa de todos los tipos de fibras detectadas, y coincidiendo con otros autores esto se corresponde con un claro aumento del tamaño de las fibras [28].

A todos los subtipos de fibras I y II del GC se les ha detectado una ultraestructura similar en todas las fibras, si bien existen algunas diferencias por la localización y, mayor o menor número de

mitocondrias, siendo el componente contráctil de las fibras similar al descrito en la bibliografía [29]. En las descripciones realizadas, tanto en el campo histoenzimológico como ultraestructural, hemos apreciado que una de las diferencias más importantes entre el GC y el CLB, es la existencia en este último de agrupamientos de fibras que hemos denominado alteradas, y se definen por una pérdida en la homogeneidad de las reacciones histoenzimológicas, junto a importantes modificaciones de sus componentes básicos [10,30].

La hipertrofia de las fibras musculares por la acción de los β -agonistas se debe principalmente a un aumento del material contráctil [31]. Este fenómeno se pudo detectar al microscopio óptico por el aumento del tamaño de las fibras, pero sin duda alguna como mejor se apreció fue al microscopio electrónico. Las miofibrillas se presentaron en número mayor, y este aumento mostró graves alteraciones [32]; estas miofibrillas aparecieron adelgazadas, mostrando una disposición longitudinal irregular, y a veces localizadas en las zonas periféricas cambiando incluso el sentido de su distribución y formando la degeneración en anillo de las fibras musculares hipertróficas, observándose finalmente una desorganización total del material contráctil de las fibras hipertróficas. Coincidiendo con estudios previos [33], la actividad de síntesis del clenbuterol sobre diversos tipos de fibras musculares, en algunas ocasiones estuvo exacerbada, perdiéndose la relación de continente y contenido. El número de las miofibrillas aumentó rápidamente originando unas reorganizaciones secundarias que modificaron profundamente la forma de las fibras musculares. Así, se observaron imágenes en las que las miofibrillas se dispusieron en arcadas, formándose las degeneraciones en huellas dactilares, pudiendo llegar incluso a mostrar canalizaciones del citoplasma [30]. La hipertrofia que se produce en las fibras por la acción del clenbuterol afectó al resto de sus componentes, destacándose una centralización de los núcleos [34]. Desde el punto de vista funcional, coincidiendo con otros autores [35], hemos observado una desorganización de los túbulos "T" y del retículo sarcoplásmico, lo que afectará a la contracción del músculo al presentar problemas la liberación de los iones de Ca^{++} y, por lo tanto, reaccionando de forma incompleta la actina sobre la miosina [9].

En conclusión, el estudio de distintos biomarcadores histopatológicos e inmunohistoquímicos de las fibras musculares tras la exposición de los animales al clenbuterol, indica la presencia de una hipertrofia muscular, miofibrilolisis y degeneración zenkeriana, observadas tanto en el estudio estructural como ultraestructural. Mediante las técnicas inmunohistoquímicas se identificó un tipo de fibra denominada alterada en el grupo tratado que no aparecía en el grupo control. Por todo ello podemos confirmar que el músculo *longissimus lumbaris* resulta una buena matriz para la investigación de la exposición a largo plazo a este compuesto en cerdos.

Bibliografía

1. Casademont G, Pérez B, Garcia JA (1996) Simultaneous determination, in calf urine, of twelve anabolic agents as heptafluorobutyl derivatives by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 686: 189-198.
2. Kim HK, Della-Fera M, Hausman DB, Baile CA (2010) Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes. *J Physiol Biochem* 66: 197-203.
3. Directiva 96/22/CE de 29 de abril de 1996, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y

- tireostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE.
4. Real Decreto 562/2009, de 8 de abril, por el que se modifica el Real Decreto 2178/2004, de 12 de noviembre, por el que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas de uso en la cría de ganado.
 5. Real Decreto 2178/2004, de 12 de noviembre, por el que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas de uso en la cría de ganado.
 6. Directiva 2008/97/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 19 de noviembre de 2008 que modifica la Directiva 96/22/CE del Consejo, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas de uso en la cría de ganado.
 7. Reglamento UE 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.
 8. Criswell DS, Powers SK, Herb RA (1996) Clenturrol-induced fiber type transition in the soleus of adult rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 74: 391-396.
 9. Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vermus B, Bonnieu A, Candau R (2011) Time course in calpain activity and autolysis in slow and fast skeletal muscle during clenbuterol treatment. *Can J Physiol Pharmacol* 89: 117-125.
 10. Lavoie J, Calderone A, Beliveau L (2002) A farnesyltransferase inhibitor attenuated beta-adrenergic receptor downregulation in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: 317-322.
 11. Pellegrino MA, D'Antona G, Bortolotto S, Boschi F, Pastoris O, Botinelli R, Polla B, Reggiani C (2004) Clenbuterol antagonizes glucocorticoid-induced atrophy and fibre type transformation in mice. *Exp Physiol* 89: 89-100.
 12. Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
 13. Blanca J, Muñoz P, Morgado M, Méndez N, Aranda A, Reuvers T, Hooghuis H (2005) Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 529: 199-205.
 14. Brumback RA, Leech RW (1987) Fishman's syndrome (encephalocraniocutaneous lipomatosis): a field defect of ectomesoderm. *J Child Neurol* 2: 168-169.
 15. Snow DH, Billeter R, Mascarello F, Carpené E, Rowierson A, Jenny E (1982) No classical type IIB fibers in dog skeletal muscle. *Histochemistry* 75: 53-65.
 16. Bakker AJ, Head SI, Wareham AC, Stephenson DG (1998) Effect of clenbuterol on sarcoplasmic-reticulum function in single skinned mammalian skeletal-muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 43: 1718-1726.
 17. Apseloff G, Gerber N (1993) Aminohydroxybutane bisphosphonate and clenbuterol prevent bone changes and retard muscle atrophy respectively in tail-suspended tras. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 1071-1078.
 18. Biolatti B, Castagnaro M, Bollo E, Appino S, Re G (1994) Genital lesions following long-term administration of clenbuterol in female pigs. *Vet Pathol* 31: 82-94.
 19. Smith DJ (2000). Total radioactive residues and clenbuterol residues in swine after dietary administration of [¹⁴C] clenbuterol for seven days and preslaughter withdrawal periods of zero, three, or seven days. *J Anim Sci* 78: 2908-2912.
 20. Pleadin J, Vulic A, Persi N, Vahcic N (2010) Clenbuterol residues in pig muscle after repeat administration in a growth-promoting dose. *Meat Sci* 86: 733-737.
 21. Dong Y, Xia X, Wang X, Ding S, Li X, Zhang S, Jiang H, Liu J, Li J, Feng Z, Ye N, Zhou M, Shen J (2011) Validation of an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ractopamine: Application to residue depletion study in swine. *Food Chem* 127: 327-332.
 22. Gil BV, Fernandez EQ, Saez AC (2001) Liquid-chromatographic analysis of clenbuterol residues in food-products of animal origin (cow liver) using diphasic dialysis extraction. *Chromatographia* 43: 271-274.
 23. López-Rivero JL, Serrano AL, Díz AM, Galisteo AM (1992) Variability of muscle fibre composition and fibre size in the horse *gluteus medius*: and enzyme-histochemical and morphometric study. *J Anat* 181: 1-10.
 24. Latorre R, Vazquez J, Ramirez G (1993) Skeletal muscle fibre types in the dog. *J Anat* 182: 329-337.
 25. Latorre R (1990) Organización morfológica e histoquímica de los distintos tipos de fibras que integran el músculo flexor carporradial del perro. *Anat Histol Embryol* 12: 34-39.
 26. Martínez Galisteo A, Serrano AL (1994) Características histoquímicas y morfométricas de algunos músculos extraoculares del perro. *Anat Histol Embryol* 23: 309-319.
 27. Matheus SSM, Soares JC (1997) Aspectos morfológicos e histoquímicos del músculo *semitendinosus*. *Anat Histol Embryol* 6: 207-209.
 28. Herrera J, Garcia-Castro JR, Rodriguez-Maldonado E, Mendieta E, Bermudez JA (2001) Sertoli cell conditioned media modulate the androgen biosynthetic pathways in rat Leydig cell primary cultures. *Arch Androl* 37: 127-133.
 29. Bloom E (2002) Tratado de Histología. 11ª Editorial. Editorial McGraw-Hill Interamericana. pp. 1025
 30. Beeckley MD, Ideus JM, Brechue WF, Kearns CF, Mckeever KH (2003) Chronic clenbuterol administration alters myosin heavy chain composition in standardbred mares. *Vet J* 165: 234-239.
 31. Choo JJ, Horan MA, Little RA, Rothwell NJ (1990) Effects of the beta 2-adrenoceptor agonist, clenbuterol, on muscle atrophy due to food deprivation in the rat. *Metabolism* 39: 647-50.
 32. Huang H, Sillence N (2000) Differential effect of dexamethasona and clenbuterol on rat growth and on beta 2-adrenoceptors in lung and skeletal muscle. *J Anim Sci* 78: 604-608.
 33. Chen KD, Alway SE (2000) A physiological level of clenbuterol does not prevent atrophy or loss of force in skeletal muscle of old rats. *J Appl Physiol* 89: 606-612.

34. Hayes A, Williams DA (1997) Examining potential drug therapies for muscular dystrophy utilising the dy/dy mouse: I. Clenbuterol. *J Neurol Sci* 157: 122-128.
35. Lynch GS, Hinke RT, Faulkner JA (2001) Force and power output of diaphragm muscle strips from mdx and control mice after clenbuterol treatment. *Neuromuscul Disord* 11: 192-196.

A modification of QuEChERS method to analyse anticoagulant rodenticides using small blood samples

Gómez-Ramírez P, Martínez-López E, Navas I, María-Mojica P and García-Fernández AJ*

Área de Toxicología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain.

Recibido 31 de mayo de 2012 / Aceptado 28 de noviembre de 2012

Abstract: The use of anticoagulant rodenticides is the most common method to control rodent plagues. Due to their physicochemical characteristics and particular mechanism of action, the application of these compounds in rural areas can pose a risk of secondary poisoning for their predators. In order to evaluate the risk of these compounds for wildlife, especially raptors that feed on rodents, biomonitoring programmes are undertaken. A fast, easy and low cost technique was needed to analyse small volumes of blood samples. Therefore, three different modifications of QuEChERS methodology have been compared, and one of them selected to detect and quantify these compounds. The process prior to analysis of the extracts involves two simple steps: the sample is extracted and partitioned using an organic solvent and salt solution. The supernatant is then cleaned using a dispersive solid phase extraction (dSPE) technique. Detection and quantification of the anticoagulant rodenticides were performed by LC-MSMS on an Agilent 1100 VL Series ESI/LC/MSD, with an electrospray ionisation (ESI) source and ion trap analyser. The method finally chosen provides a 72-134% recoveries for the seven rodenticides (warfarin, coumatetralyl, brodifacoum, bromadiolone, difenacoum, chlorofacinone, diphacinone), higher than in other methods to analyse similar compounds. Sensitivity of our method is also higher than in other methods. In order to prove the utility of the technique, a total of 50 blood samples of free-living Eagle owls (*Bubo bubo*) were analysed.

Key words: Anticoagulant rodenticides, blood, quechers, biomonitoring

Resumen: Adaptación del método QuEChERS para el análisis de rodenticidas anticoagulantes en pequeños volúmenes de sangre.

El uso de rodenticidas anticoagulantes es el método más frecuentemente utilizado para el control de plagas de roedores. Debido a sus características físico-químicas y particular mecanismo de acción, la utilización de estos compuestos en zonas rurales puede suponer un riesgo de intoxicación secundaria de sus depredadores. Para evaluar el riesgo a estos compuestos para la fauna silvestre, especialmente en aves rapaces que se alimentan de roedores, se llevan a cabo los programas de biomonitorización. Se ha desarrollado un método rápido, fácil y económico que permita el análisis de pequeños volúmenes de muestra de sangre. En el presente trabajo se han comparado tres diferentes modificaciones de la metodología "QuEChERS", y posteriormente uno de ellos fue elegido para la detección y cuantificación de estos compuestos. El proceso previo al análisis de los extractos incluye dos pasos sencillos: La muestra es extraída usando un solvente orgánico y una solución salina y, posteriormente, el sobrenadante es purificado usando una técnica de extracción en fase sólida dispersiva. La detección y cuantificación de

los rodenticidas anticoagulantes se realizó por cromatografía líquida acoplada a un detector de masas Agilent 1100 VL con trampa de iones y fuente de electrospray para ionización. La técnica finalmente elegida permite una recuperación entre 72-134% para los siete rodenticidas objeto de estudio (warfarina, cumatetralilo, difenacoum, clorofacinona, brodifacoum, bromadiolona, difacinona), la cual es superior a la obtenida con otras técnicas que analizan compuestos similares. Además, la sensibilidad de esta técnica es mayor a la que ofrecen otras técnicas. Con el fin de comprobar la utilidad de la técnica validada, se analizaron un total de 50 muestras de sangre de búho real (*Bubo bubo*) capturados en su hábitat natural.

Palabras clave: Rodenticidas anticoagulantes, sangre, quechers, biomonitorización

Introduction

Rodent infestations have posed serious economic and sanitary problems for the humanity during centuries. Nowadays it still constitutes an issue of concern, especially for the agriculture, due to the economical damages to crops. Because physiology and ethology of rodents complicate their eradication, the use of chemical compounds have become necessary, being anticoagulant rodenticides (ARs), such as warfarin, coumatetralyl, difenacoum, brodifacoum, bromadiolone and difacinone, the most commonly used [1].

The mechanism of action of these compounds is based on the inhibition of vitamin K epoxide reductase, which results in a lack of active vitamin K and a disruption in the activation of blood clotting factors (II, VII, IX and X) [2,3]. Due to the plasma clotting factors half life, a lag time between the ingestion of anticoagulants and the onset of clinical signs exists [4]. As soon as circulating clotting factors are lost by normal attrition, fatal haemorrhages may happen [5]. On the other hand, poisoned animals can suffer somnolence, weakness, pale mucosa, decreased or lacking appetite, decreased locomotion and perception and rapid and easy exhaustion [6]. As a consequence, these individuals are more susceptible to be predated or suffer accidents [5]. In addition, sublethal levels of rodenticides may persist up to a year in the body [8], and repeated low-dose exposure can lead to accumulation and fatal haemorrhages [5]. This high persistence in the body implies a higher risk of secondary poisoning in predators, especially in birds like owls that mainly prey on rodents [5,7,9]. In fact, several cases of secondary poisoning have been documented in different raptor species [10-15]. In the case of birds inhabiting rural areas, this risk can even be higher [16]. The assessment of toxic exposure in wildlife is carried out through monitoring studies, best using non-destructive samples such as blood. In the case of birds, the small sampling volume is a limiting factor in most species, since only a 10% of the total blood volume in body is

*e-mail: ajgf/um.es

usually collected. Hence, analytical methods that use the less sample volume as possible are needed.

An increasing number of techniques to analyse anticoagulant rodenticides in small samples of animal tissues have been developed [9,14-18]. However, they usually consist in extractions using organic solvents and purifications by solid phase extraction columns, which can sometimes be both expensive and time-consuming, due to the large volumes of solvent for activation of the columns, washing of the sample, and elution of the analytes [19]. Because an appropriate clean up of samples is essential prior chromatographic analyses, special care should be taken in order to obtain the best accuracy but the less matrix effect as possible. In this sense, methods like QuEChERS (short name for quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) have been successful in the analyses of several compounds, including anticoagulant rodenticides in animal tissues [19]. Regarding instrumentals, ultraviolet spectrometer or fluorescence detectors coupled to HPLC have been used to detect anticoagulant rodenticides [9,11,18]. However, since mass spectrometer detectors have proved higher sensitivity, the use of HPLC-UV may have markedly underestimated the true scale of exposure of other non-target species to anticoagulant rodenticides [20].

As mentioned above, wildlife biomonitoring studies using bird samples demand for the use of very small sample amounts but sufficient to detect very low levels of contaminants. This implies the improvement of analytical techniques in order to become the most sensitive as possible. According to this, and based on existing QuEChERS method to analyse trace levels of pesticides in food [21], slight modifications were made to reduce solvent, sample amount and reagents

Material and methods

Biological samples

Whole blood samples were obtained from healthy dogs kept in the Murcia City's Municipal Zoonosis Control Centre. Blood was taken by puncturing the jugular vein with a 23G needle and a 10 ml syringe, using heparin (Analema, Vorquímica S.L.) as anticoagulant. In order to prove the applicability of the validated technique, a total of 50 blood samples from free-ranging Eagle owls (*Bubo bubo*) (9 adults and 41 one month-old nestlings) were analysed. These samples were obtained by puncturing brachial vein with a 23G needle and a 5 ml syringe, using heparin as anticoagulant. Samples were immediately taken to the laboratory under refrigerated conditions and frozen to -40°C until processing.

Sample preparation

The method used is a modification of the technique described by Anastasiades et al. [21], based on dispersive solid phase extraction (dSPE), commonly known as QuEChERS.

About 2 ml of sample (spiked dog blood or eagle owl blood) were mixed with 2 ml of solvent (according to method; table 1). The mix was shaken vigorously with a vortex for about a minute and a combination of salts (1.33 g magnesium sulphate, 0.33 g sodium chloride, 0.17 g sodium citrate dibasic sesquihydrate and 0.33 g sodium citrate tribasic dehydrate) was then added. Tubes were again vigorously shaken with vortex. This mix separates the liquid phase and stabilizes the analytes. The tubes were centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes with a centrifuge Sanyo® MSE MISTRAL 2000 R and frozen at -4°C for 1 hour. The supernatant was then transferred to

another tube and mixed with a mix of 300 mg magnesium sulfate, 50 mg PSA y 50 mg DSC-18. The tube was shaken similarly to the first step and then centrifuged again at 3000 rpm for 5 minutes. The supernatant was evaporated until dryness and redissolved in 1ml solvent (according to method; table 1) acidified with 10 µl of formic acid 5% in acetonitrile.

Table 1. Solvents and volumes used for extraction and purification of anticoagulant rodenticides using three versions of a modified QuEChERS methodology.

	Sample	SOLVENTS USED	
		First step extraction	Final redissolution prior to analysis
Method A	2 ml blood	2 ml Methanol	1 ml Methanol
Method B	2 ml blood	2 ml Acetonitrile	1 ml Acetonitrile
Method C	2 ml blood	2 ml Acetonitrile	1 ml Methanol

Chemicals and standards

Rodenticide reference standard chlorophacinone (96%) was obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany) while warfarin (98%), difenacoum (98.7%), coumatetralyl (99.5%), diphacinone (99%), brodifacoum (99.8%) and bromadiolone (98.8%) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Acetonitrile and methanol were obtained from Lab-Scan® (Poland) and formic acid from Probus® (Spain). All these solvents and reagents were of residue quality (>99.9% purity). Magnesium sulfate, sodium chloride, sodium citrate dibasic sesquihydrate, sodium citrate tribasic dihydrate, PSA bonded silica (supelclean PSA: Polymerically bonded, ethylenediamine-N-propyl phase that contains both primary and secondary amines) and C18 (Discovery DSC-18: octadecylsilane 18% C) were purchased from Supelco® (USA).

Stock solutions of 1.0 mg/ml of the standard compounds were prepared by dissolving 10.0 mg of each compound in 10 ml of methanol. A standard mix containing all the rodenticides was made at 1000 µg/ml by mixing a portion of stock solution of each compound with an appropriate amount of HPLC grade methanol. This mix was used to spike the dog blood samples.

Instruments and conditions

Detection and quantification of the anticoagulant rodenticides were performed on an Agilent 1100 Series ESI/LC/MSD ion Trap VL, consisting of a non-line solvent degasser, binary pump, autosampler and column temperature module, with an electrospray ionisation (ESI) source and ion trap analyser, all controlled with the HP Chemstation software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The separation was performed on a Waters Sunfire C8 column of 150mm x 4.6 and 5 µm particle size. Column was held at a constant temperature of 25°C. The mobile phase was water with ammonium acetate 20 mM (A) and methanol with ammonium acetate 20 mM (B) at a flow rate of 0.8 ml/min and a gradient where at t=0 min, 50% B and at t=22 min 95% B. The electrospray interface was set in negative ionization mode, selecting the precursor ions and introducing helium gas into the trap to induce collision. Throughout all the measurements the analytes were detected in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Detection parameters are described in table 2.

Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were defined as the lowest concentration detected and quantified under the established conditions for which the method was validated. LOD and LOQ were 5ppb for all the compounds except for difenacoum which was 1 ppb.

Table 2. Data acquisition parameters for seven anticoagulant rodenticides in multiple reaction monitoring (MRM) analysed by LC-MSMS with an electrospray ionisation (ESI) source and ion trap analyser.

Rodenticide	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Retention time (min)
Warfarin	307.0	160.7; 249.7	6.5-6.6
Coumatetralyl	291.0	246.8; 140.7;	7.8-7.9
Diphacinone	340.0	145.8; 167.8;	11.1
Chlorophacinone	373.0	200.7; 144.7	14.2-14.3
Bromadiolone	526.0	464.9; 360.6; 508.7	16.3
Difenacoum	443.0	292.9; 398.9; 442.9; 186.8	17.2
Brodifacoum	522.0	520.9; 476.8; 186.8	19.2

Statistical analyses

Statistical analysis of the data was performed using SPSS v15.0 statistical software (SPSS Inc., 1989-1999).

Results and discussion

Extraction optimization

Three analytical methods were compared in order to improve accuracy and precision of the analyses of anticoagulant rodenticides (Table 1). These methods are based on the dispersive solid phase extraction (dSPE), commonly known as QuEChERS described by Anastassiades et al [21].

Method validation

The objective of the validation of an analytical method is to provide evidence that a method is fit for the purpose for which it is to be used, by being tested for accuracy and precision [22]. These parameters were studied for each of the methods, in order to select the best for the analyses of rodenticides.

Accuracy

Accuracy of the method was assessed by studying the recovery of rodenticides in dog blood samples spiked with a mix of the compounds of interest (warfarin, coumatetralyl, brodifacoum, bromadiolone, difenacoum, chlorophacinone, diphacinone). Dog blood samples were analysed as blank in quintuplicate in order to ensure that they were free from rodenticides and to test matrix effect. Recoveries of rodenticides were tested using five replicates of spiked blood samples at three levels (20, 40 y 80 ppb). The extraction recoveries were determined by comparing peak heights obtained from extracted spiked samples with peak heights obtained in the working standard solutions. The method that provided the best recovery frequency was chosen. This frequency was calculated as follows: $Recovery (\%) = (C_m/C_p) \times 100$, where C_m is the concentration of each compound in the sample and C_p is the concentration of each compound in the standard solution.

Linearity

Linearity of an analytical method is the ability to elicit test results that are directly proportional to the concentration of analytes in samples within a given range. The range and number of levels of fortification are highly related to the applicability of the method. In this case, linearity was calculated using a blank sample as 0 and five replicates of spiked blood samples with the mix of 7 rodenticides at three levels (20, 40 y 80 ppb).

Linear regression of data to a calibration curve was performed using the method of least squares. The acceptance criterion for linearity was a correlation coefficient $r = 0.9$.

Precision

Precision of a method can be defined by repeatability and reproducibility tests. Repeatability is used to prove the ability to provide similar results when the technique is repeated in the same sample, by the same operator. The acceptance criteria is based on the relative standard deviation (RSD), which is calculated analysing five replicates of spiked blood samples with the mix of 7 rodenticides at three levels (20, 40 y 80 ppb). This is calculated as follows: $RSD (\%) = (SD/X_m) \times 100$ where SD is the standard deviation of the whole series of measurements, whose mean is X_m . The acceptance criterion for repeatability was RSD = 20%.

Reproducibility proves the ability to provide similar results when the technique is repeated in the same sample but by different operators or different laboratories. To validate reproducibility of our technique, 5 aliquots of the same sample of dog spiked blood (40 ppb) were analysed by different analysts and different days. Reproducibility acceptance criterion was RSD = 20%.

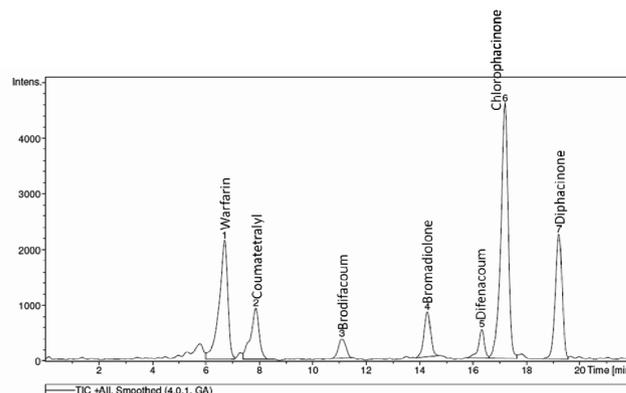
Method development

As mention above, accuracy or recovery is assessed using spiked samples. Mean recoveries for each of the methods evaluated are presented in table 3. Although recoveries for method B could be considered acceptable for most of the compounds analysed (57-97%), method C was definitely chosen because it provided the maximum recovery values. Range of mean recoveries for method C was 72-134% for all the 7 anticoagulant rodenticides (Table 3). A representative chromatogram of spiked blood samples is shown in Figure 1.

Table 3. Accuracy, linearity and precision of seven anticoagulant rodenticides from spiked blood samples analysed by LC-MSMS with an electrospray ionisation (ESI) source and ion trap analyser.

Rodenticide	Mean recovery data (%)*			Method C validation		
	Method A	Method B	Method C	Linearity (R)	CV Repeatability (%)*	CV Reproducibility (%)**
Warfarin	60.04	88.74	104.06	0.96	11.04	7.95
Coumatetralyl	50.50	56.94	134.54	0.95	9.20	8.00
Diphacinone	28.94	44.58	74.15	0.99	32.33	37.55
Chlorophacinone	39.87	74.36	86.26	0.97	10.24	11.87
Bromadiolone	28.07	96.95	128.79	0.90	14.60	12.01
Difenacoum	43.38	85.80	93.45	0.97	5.84	10.51
Brodifacoum	29.67	61.92	72.59	0.93	7.56	5.07

R= Correlation coefficient, RSD=Relative standard deviation, in %. *Average recovery for three spiking levels. **Average of five measurements at one spiking level.

**Fig.1** Chromatogram of a spiked dog blood sample analysed by LC-MSMS with an electrospray ionisation (ESI) source and ion trap analyser using the extraction method C (2 ml acetonitrile and 1 ml methanol).

Regarding linearity, a good correlation between concentrations of rodenticides/area of chromatographic peak was found for each compound, since correlation coefficients were above 0.95 with the only exception of bromadiolone ($r=0.90$) and brodifacoum ($r=0.93$).

RSD of repeatability and reproducibility indicated a good precision of the method, as they were lower than 15%, lower values than the threshold of 20% that had been set to accept the validation of the analytical method. The only exception was difacinone, whose RSD of repeatability and reproducibility were 32% and 38%, respectively.

Mean recoveries for other methods described to analyse anticoagulant rodenticides in animal samples range between 52-70% [9, 15, 18, 19], which were lower than the values obtained in our technique. On the other hand, also our detection limits are in general lower than in those techniques, were the lowest was 2 ppb for the same group of compounds as we analysed [15, 17].

While this is not the first modification of a Quechers method to analyse anticoagulant rodenticides in blood [19], a better accuracy and sensitivity has been obtained, since their lowest LOD was 10 ppb and recoveries ranged between 68-97% [19]. In addition, the validation of our method has reduced both the use of solvents and reagents and the time required for the analyses. This implies a great advantage in order to reduce laboratory expenses and to optimize laboratory work.

Applicability of the technique

Eagle owl blood samples from free-ranging animals were analysed to assess their exposure to anticoagulant rodenticides. However, any compound could be detected in any sample. This could be due to the toxicokinetics of these compounds: after ingestion of contaminated prey items, concentrations of anticoagulants in blood usually persist only a few days and are rapidly transported and accumulated in liver, where they may persist up to a year [8].

Conclusions

The technique herein described can be considered acceptable as a method for the analyses of residues of multiple anticoagulant rodenticides in whole blood samples. The fact that a small sample amount (2 ml) can be used is especially of interest in the case of biomonitoring programs, particularly in raptors that mainly prey on rodents.

Aknowledgements

To Pedro J. Jiménez and Murcia City's Municipal Zoonosis Control Centre for providing dog blood samples. To the Seneca Foundation (08758/PI/08) and to the Ministry of Science and Innovation of the Spanish Government (CGL-2008-4318/BOS and NOVEDAR-Consolider) for the funding. To Silvia Espín, José Antonio García and Pablo Cabo for their collaboration in the laboratory. To José Rodríguez (University Service of Scientific Instrumentation of the University of Murcia) for the collaboration in the liquid chromatography analyses.

References

- Moreno-Marí J., López-Ferrer J., Jiménez-Peydró R (2004) El control de los roedores: revisión de los rodenticidas registrados en el ámbito de la sanidad ambiental en España. *Rev Esp Salud*

Pública 78:5-16

- Craciun AM, Groenen-Van Dooren MM, Thijssen HH, Vermeer C (1998) Induction of prothrombin synthesis by K-vitamins compared in vitamin K deficient and in brodifacoum-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 1380:75-81
- Craciun AM, Groenen-Van Dooren MM, Vermeer C (1997) Nutritional vitamin K-intake and urinary gamma-carboxyglutamate excretion in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1334:44-50
- Murphy MJ, Talcott PA (2001) Anticoagulant rodenticides. En: Peterson ME, Talcott PA (cols). *Small mammal toxicology*. WB Saunders Company, Philadelphia. 406-419
- Stone WB, Okoniewski J, Stedelin JR (2003) Anticoagulant rodenticides and raptors: Recent findings from New York, 1998-2001. *Bull Environ Contam Toxicol* 70:34-40
- Valchev I, Binev R, Yordanova V, Nikolov Y (2008) Anticoagulant rodenticide intoxication in animals-a review. *Turk J Vet Anim Sci* 32:237-243
- Stone WB, Okoniewski J, Stedelin JR (1999) Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J Wildl Dis* 35:187-193
- EPA (2004) Potential risks of nine rodenticides to birds and nontarget mammals: a comparative approach. P.2004.27A
- Walker LA, Turk A, Long SM, Wienburg CL, Best J, Shore RF (2008) Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Sci Total Environ* 393:93-98
- Olea PP, Sánchez-Barbudo IS, Viñuela J, Barja I, Mateo-Tomás P, Piñeiro A, Mateo R, Purroy FJ (2009) Lack of scientific evidence and precautionary principle in massive release of rodenticides threatens biodiversity: old lessons need new reflections. *Environ Conservat* 36:1-4
- Berny PJ, Buronfosse T, Buronfosse F, Lamarque F, Lorgue G (1997) Field evidence of secondary poisoning of Foxes (*Vulpes vulpes*) and Buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere* 35:1817-1829
- Newton I, Dale L, Finnie JK, Freestone P, Wright J, Wyatt C, Wyllie I (1998) *Wildlife and Pollution: 1997/98*. Joint Nature Conservation Committee, Peterborough, UK, Annual Report. JNCC Report No. 285
- Newton I, Shore RF, Wyllie I, Birks JDS, Dale L (1999) Empirical evidence of side-effects of rodenticides on some predatory birds and mammals. En: Coward DP and Feare CJ (cols). *Advances in vertebrate pest management*. Filander Verlag, Fürth, Germany. 347-367
- Albert CA, Wilson LK, Mineau P, Trudeau S, Elliott JE (2010) Anticoagulant rodenticides in three owl species from Western Canada, 1988-2003. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:451-459
- Murray M (2011) Anticoagulant rodenticide exposure and toxicosis in four species of birds of prey presented to a wildlife clinic in Massachusetts, 2006–2010. *J Zoo Wildl Med* 42(1): 88–97
- Eason CT, Murphy EC, Wright GRG, Spurr EB (2002) Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicology* 11:35-48

17. Vandenbroucke V, Desmet N, De Backer P, Croubels S (2008) Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chrom B*, 869 (1-2): 101-110
18. Elmeros M, Christensen TK, Lassen P (2011) Concentrations of anticoagulant rodenticides in stoats *Mustela erminea* and weasels *Mustela nivalis* from Denmark. *Sci Total Env* 409 (12): 2373-2378.
19. Vudathala D, Cummings M, Murphy L (2010) Analysis of multiple anticoagulant rodenticides in animal blood and liver tissue using principles of QuEChERS method. *J Anal Toxicol* 34:273-279
20. Dowding CV, Shore RF, Worgan A, Baker PJ, Harris S (2010) Accumulation of anticoagulant rodenticides in a non-target insectivore, the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Environ Pollut* 158:161-166.
21. Anastassiades M, Lehotaý SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 86:412-431
22. SANCO, National Food Administration, Uppsala, Sweden (2007) Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANCO/2007/3131.

Presencia de rodenticidas anticoagulantes en cinco especies de aves rapaces de las Islas Canarias, 2003-2011

Ruiz-Suárez N¹, Boada LD¹, Henríquez-Hernández LA¹, Almeida González M¹, Calabuig P², Estévez-López D², Zumbado M¹, Rodríguez-Hernández A¹, Camacho M^{1,2} y Luzardo OP^{1*}

¹Unidad de Toxicología. Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Veterinaria/Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apartado de correos 550, 35080 Las Palmas de Gran Canaria. ²Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (CRFS) de Tafira (Gran Canaria).

Recibido 3 de mayo de 2012 / Aceptado 27 de noviembre de 2012

Resumen: Se determinó la presencia de residuos de rodenticidas anticoagulantes por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo en el hígado de 61 aves rapaces muertas provenientes del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira (Gran Canaria), pertenecientes a 5 especies de las 11 presentes en el archipiélago canario. Se encontraron residuos en 42 animales (69%) si bien en sólo 1 de ellos se consideró la intoxicación por rodenticidas como causa primaria de muerte, según los datos clínicos, analíticos y de necropsia. De las rapaces estudiadas, fueron las especies *Tyto alba* y *Accipiter nisus* las que más frecuentemente presentaron residuos de anticoagulantes (85% y 89% respectivamente). Se detectaron residuos de 5 anticoagulantes, todos ellos de segunda generación, siendo la bromadiolona las más frecuentemente detectada, seguida del brodifacoum y del difenacoum. Un elevado número de las muestras positivas (63%) presentó más de un residuo de anticoagulantes en su hígado, habiéndose encontrado mezclas de hasta 4 productos diferentes. Llamó la atención que la mayoría de los animales que ingresaron en el centro de recuperación por politraumatismo por colisión presentaba residuos de uno o varios anticoagulantes, así como que rapaces que se alimentan principalmente de pájaros también presentaron frecuentemente residuos de estos compuestos. Los resultados de este estudio sugieren que el elevado uso de rodenticidas anticoagulantes en el medio natural implica su incorporación a la cadena trófica, viéndose afectadas especies de fauna silvestre en las que estos productos podrían producir efectos adversos. Esto implica que la aplicación de rodenticidas anticoagulantes en espacios abiertos supone una amenaza para el estado de conservación de la biodiversidad de las Islas Canarias.

Palabras clave: Rodenticidas anticoagulantes, aves rapaces, Islas Canarias, hígado, residuos de pesticidas

Abstract: Presence of anticoagulant rodenticide residues in five predatory birds species of the Canary Islands, 2002-2011. Anticoagulant rodenticide (AR) levels were studied in liver of 61 dead raptors of five of the eleven species of the Canary Islands. The animals were delivered to our laboratory from the Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira (Gran Canaria). Anticoagulant residues were detected in 42 (69%) of the studied animals, but only 1 may have died by AR poisoning according to the clinical information, necropsy findings and toxicological analysis. Of the studied raptors *Tyto alba* and *Accipiter nisus* were the species with more frequency and higher levels of anticoagulants (85% and 89%). Residues of 5 anticoagulants were detected, all of them of second generation, being the most frequently detected bromadiolone, brodifacoum and difenacoum. A large number of samples (63%)

presented more than one residue of anticoagulants in their livers, and we have found as much as 4 different residues in one animal. It was remarkable that most of the animals that had suffered polytraumatism by collision presented residues of anticoagulants, and that species such as the hawk that mainly eat birds frequently presented anticoagulant residues. The results of this study suggest that the high use of anticoagulant rodenticides in the natural environment involves their incorporation into the food chain, and this can affect wildlife species in which these products may cause side effects. This means that the application of anticoagulant rodenticides in open spaces poses a threat to the conservation status of biodiversity in the Canary Islands.

Key words: Anticoagulant rodenticides, predatory birds, Canary Islands, liver, pesticide residues

Introducción

Las poblaciones de roedores siguen siendo para el sector agrícola una de las principales causas que aún hoy en día da lugar a cuantiosas pérdidas económicas, no sólo en las cosechas antes de su recogida sino durante el almacenamiento de las mismas [1]. Estas poblaciones también son punto de mira de Salud Pública, ya que aparte de causar daños materiales, es bien conocida su capacidad para transmitir enfermedades causantes de zoonosis a las personas como es el caso de la leptospirosis o la peste [2-4].

Uno de los métodos preferidos y ampliamente utilizado para su control desde años atrás son los rodenticidas anticoagulantes que provocan en ellos una muerte por hemorragia [5]. Los primeros rodenticidas anticoagulantes en utilizarse fueron aquellos conocidos como anticoagulantes de primera generación y su utilización parte de los años 40. Debido a una continua exposición de los roedores a estos productos y a su amplio uso empezaron a aparecer resistencias frente a lo cual se desarrollaron nuevas fórmulas químicas. Así sobre los años 70 aparecieron los nuevos rodenticidas conocidos como rodenticidas de segunda generación o superwarfarinas. Entre estas nuevas moléculas se encuentran la bromadiolona, el brodifacoum, el difenacoum, el flocoumafen, la clorofacinona y la difacinona [6-7]. Estos últimos son más potentes y de mayor vida media que aquellos conocidos como de primera generación y se consideran tóxicos tras una dosis única [7].

El mecanismo de acción de estas sustancia se centra en inhibir a la vitamina k epóxido reductasa, propiciando que la vitamina K no se regenere y por tanto los factores II, VII, IX y X no puedan sufrir la carboxilación post-transcripcional necesaria para su activación. Esto provoca una alteración en la coagulación de la sangre que predispone a los animales a una muerte por hemorragias [6,7].

*e-mail: operez/dcc.ulpgc.es

En Canarias, durante los últimos años, los Cabildos y Ayuntamientos han venido colaborando en la lucha contra las plagas de roedores, mediante la concesión gratuita de productos raticidas a un amplio número de agricultores y ganaderos con la finalidad de que su aplicación en fincas e instalaciones ejerza un efecto sinérgico frente a la prevención llevada a cabo por otras administraciones en parques, carreteras y demás zonas comunes [8]. No obstante, estos productos, al no ser aplicados por personal especializado, son colocados en muchas ocasiones en espacios abiertos sin protección, lo que permite que muchos animales silvestres tengan acceso directo a los mismos [9]. Además hay que tener en cuenta que los roedores después de haber consumido una dosis letal no enferman ni mueren al instante, sino que lo hacen a lo largo de los días. Posteriormente los animales enferman y van a experimentar un cambio en sus hábitos lo que conlleva a que tengan un comportamiento errático o estén más tiempo en espacios abiertos lo que propicia a que se conviertan en presas más fáciles para los depredadores [10]. Durante el periodo en que estos animales se están alimentando de los cebos pueden llegar a consumir unas 8-10 veces la DL_{50} de los productos habitualmente utilizados en las campañas de desratización [9].

Todo ello conlleva a una exposición de muchos animales de vida silvestre a rodenticidas anticoagulantes, la cual esta ampliamente documentada [5,11-15]. El patrón normal de alimentación de las aves rapaces incluye a muchos de los roedores contra los que van dirigidas estas sustancias, pero también aves granívoras que en ocasiones han ingerido accidentalmente los cebos preparados a base de cereal [16]. Como consecuencia de ello, varios estudios constatan la presencia de residuos de estas sustancias en tejidos de las aves rapaces [12, 16-18], y se constata que en muchas ocasiones esta exposición les produce una intoxicación secundaria que les puede producir un debilitamiento o incluso la muerte [16,17,19].

Las aves rapaces nidificantes en las Islas Canarias pertenecen a siete especies diurnas y dos nocturnas, con un total de 11 subespecies, de las que cuatro son endémicas canarias y dos macaronésicas [20]. Las poblaciones de rapaces del archipiélago han sufrido una importante regresión durante las últimas décadas y en la actualidad el nivel de conservación de las especies es bastante desconocido por falta de estudios recientes. El propósito de este trabajo es describir el nivel de contaminación por rodenticidas anticoagulantes orales de primera (warfarina y cumatetralilo) y segunda generación (bromadiolona, brodifacoum, difenacoum, difetialona, clorofacinona y difacinona) en 61 animales pertenecientes a cinco de las especies de rapaces existentes en las Islas Canarias. Además se examinaron las diferencias en los niveles de contaminación entre especies, isla de procedencia, patrón diurno/nocturno, condición corporal y causa de muerte, ya que se postuló como hipótesis de partida que los niveles de residuos de anticoagulantes, aún estando en concentraciones subletales, pueden suponer una amenaza para el estado de conservación de alguna de estas especies.

Material y métodos

Toma de muestra y datos biométricos

En el presente estudio se han empleado muestras procedentes de 3 especies de rapaces diurnas y 2 nocturnas. Dentro de las especies diurnas se incluyeron 14 ejemplares de cernícalo (*Falco tinnunculus*); 9 ejemplares de gavilán (*Accipiter nisus*); y 11 ejemplares de halcón tagarote (*Falco pelegrinoides*). Como especies nocturnas se estudiaron 14 ejemplares de búho chico (*Asio otus*) y 13

de lechuza (*Tyto alba*). Todos los animales incluidos en el estudio se recibieron en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira (CRFS de Tafira) durante el periodo comprendido entre 2003 y 2011. Los animales objeto de este estudio han sido incluidos con independencia del motivo de ingreso en el CRFS de Tafira. Estos animales, tanto vivos como cadáveres encontrados, se iban guardando para su posterior estudio y toma de muestras. Aproximadamente el 50% de las aves ingresaban muertas o fallecían al día siguiente de su ingreso en el CRFS de Tafira debido a su mal estado general o las lesiones sufridas. El resto de los animales incluidos en este estudio fallecieron durante la estancia en el CRFS. Todos los cadáveres eran custodiados en el centro para su análisis posterior.

La muestra empleada en este trabajo ha sido el hígado, ya que suele ser el órgano de elección para la búsqueda de los residuos de rodenticidas anticoagulantes debido a la alta afinidad y persistencia que presentan estas sustancias en el tejido hepático [21,22]. Una vez programada la toma de muestras, se tomaron los datos biométricos: longitud, envergadura, peso, sexo y edad aproximada y se practicaba una necropsia reglada durante la cual se valoraba la condición corporal y se extraían los hígados, que eran transportados en hielo seco al laboratorio de toxicología de La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria donde se almacenaban a -20°C hasta su procesado.

Anticoagulantes analizados y preparación de soluciones

Se incluyeron en este estudio los rodenticidas anticoagulantes más frecuentemente utilizados en las campañas de desratización en Canarias: warfarina y cumatetralilo como compuestos de primera generación y bromadiolona, brodifacoum, difenacoum, difetialona, clorofacinona y difacinona, como rodenticidas de segunda generación. Los estándares puros (>99.5%) de todas estas sustancias fueron de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania). Como estándar interno se utilizó un rodenticida anticoagulante no utilizado en España, la pindona (>98%, Sigma-Aldrich-Fluka, Manheim, Alemania).

Se preparó una solución inicial de cada estándar pesando 10 mg y añadiendo metanol para obtener una concentración final de 1000 µg/mL. A partir de estas soluciones diluyendo con metanol se preparó una solución de trabajo conteniendo todos los analitos excepto el estándar interno, a una concentración de 5 µg/ml. Esta solución de trabajo fue utilizada como solución de fortificación a partir de la cual, diluyendo con acetonitrilo, se prepararon las soluciones estándar para la preparación de la recta de calibrado de 0,2 a 200 ng/mL.

Preparación de la muestra

El tejido hepático de las rapaces fue disgregado con un ultraturrax (yellowline DI 25 basic) en un tubo de borosilicato con capacidad para 15 ml. 1 gramo de la muestra así tratada fue mezclado con 2 gramos de Celite® 503 (Sigma-Aldrich-Fluka, Manheim, Alemania) y se añadieron 20 µl de una solución de estándar interno a 10 µg/ml. A la mezcla se le añadieron 10 ml de 50% diclorometano – 30% acetona – 20% dietiléter. La mezcla fue agitada vigorosamente durante un minuto y sometida a ultrasonificación durante 10 minutos. Se dejó la muestra en agitación orbital automática durante 30 minutos. Posteriormente el tubo se centrifuga a 4000 rpm 10 minutos y el sobrenadante se pasa por un filtro de disco de 0.45 µm (Chromafil® PET-20/15, Macherey-Nagel, Alemania) y el disolvente se evaporó bajo corriente de nitrógeno (TechneDry block DB3). Para purificar el extracto obtenido el residuo obtenido se resuspendió en 1 ml de 50% acetato de etilo – 50% de ciclohexano para someterlo cromatografía de permeación en gel (GPC) en una columna de vidrio de 600x15 mm

rellena con la resina BioBeads SX3 (BioRadLaboratories, EE.UU.) El eluido obtenido entre los minutos 25-75 a un flujo de 2 ml/min de 50% acetato de etilo – 50% de ciclohexano era recogido en un matraz y el disolvente evaporado usando un rotavapor (Heidolphlaborota 4000 efficient). Para recuperar los analitos el matraz fue sometido a 3 lavados de 4 ml de la mezcla 50% diclorometano – 30% acetona – 20% dietiléter. Los tres volúmenes fueron combinados en un tubo de ensayo de borosilicato y el disolvente evaporado completamente bajo corriente suave de nitrógeno. El residuo seco fue finalmente resuspendido en 1 ml de acetonitrilo, filtrado por 0,45 µm y transferido a un vial de cromatografía. A cada vial se le añadieron 20 µl de la solución de estándar interno. Los viales así preparados fueron utilizados para el análisis cromatográfico.

Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos fueron realizados usando un equipo de UPLC modelo Accela Ultra acoplado en tándem a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quantum Access Max (ambos equipos de Thermo Fisher Scientific Inc, San José, EE.UU.).

La separación cromatográfica se realizó usando una columna analítica Accucore C18 2.6 µm, 150x3 mm (Thermo Fisher Scientific Inc, San José, EE.UU.). Las fases móviles fueron (A) Agua milli-Q como fase acuosa y (B) Metanol grado HPLC-MS como fase orgánica. Se trabajó a un flujo de 800 µl/min y el volumen de inyección fue de 25 µl. La carrera cromatográfica duró 5 minutos a 25°C y se realizó con un programa de gradiente de la siguiente forma: 0-1 min: 50% A; 1-1,5 min: 50% A 5% A; 1,5-3,5 min: 5% A; 3,5-3,7 min: 5% A 50% A; 3,7-5 min: 50% A.

El espectrómetro de masas y la fuente de ionización por electrospray H-ESI-II se programaron con los siguientes parámetros: skimmer offset (4V), gas de impulsión (10 unidades arbitrarias); gas auxiliar (8 unidades arbitrarias); temperatura del capilar (250°C); voltaje del spray (3500 V); temperatura de vaporización (200°C). El espectrómetro se programó en modo de ionización negativa. Para el desarrollo del método de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) los analitos se introdujeron por infusión continua directamente en la fuente de ionización y se calcularon las transiciones MS/MS y las energías de colisión óptimas para cada uno de ellos. En la Tabla 1 se relacionan las reacciones SRM que se seleccionaron para la identificación y cuantificación de cada uno de los anticoagulantes incluidos en el método. Para todos ellos se eligieron 3 fragmentos derivados del mismo ión padre ([M-H]⁺). La anchura de pico se fijó en 0.7 Da tanto en los cuadrupolos Q1 y Q3, y la presión de argón en la celda de colisión (Q2) fue fijada en 0,002 mbar. La cuantificación de todos los analitos se hizo mediante calibración interna. La linealidad del método fue comprobada mediante la realización de rectas de calibrado de 8 puntos en el rango de 0,2 a 200 ng/ml. La repetitividad del método fue determinada mediante 6 inyecciones repetidas de una mezcla de estándares a 50 ng/ml, y la reproducibilidad utilizando seis replicados individualmente preparados de la misma solución. Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) del método fueron definidos como los valores de señal correspondiente a un valor de señal/ruido de 3 y 10, siendo sus valores de 0,02 ng/g y 0,05 ng/g, respectivamente.

Resultados y discusión

Del total de muestras analizadas en un 69% de los casos se detectó la presencia de residuos de al menos un anticoagulante, lo cual coincide

Tabla 1. Parámetros de programación del modo SRM del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para los rodenticidas anticoagulantes incluidos en el estudio

Compuesto	precursor	Ión padre	Iones hijo	Energía de colisión	Voltaje de cono
Warfarina	[M – H] ⁺	307,1	250,0	24	56
			169,9	21	56
			116,9	39	56
Cumatrelalilo	[M – H] ⁺	291,1	140,9	28	65
			247,0	22	65
			142,9	49	65
Clorofacinona	[M – H] ⁺	373,1	200,9	25	123
			144,9	29	123
			116,0	50	123
Difetialona	[M – H] ⁺	537,2	150,9	45	100
			370,9	36	100
			202,9	46	100
Bromadiolona	[M – H] ⁺	525,0	249,9	37	96
			180,9	37	96
			219,0	64	96
Brodifacoum	[M – H] ⁺	521,0	135,0	44	108
			186,9	39	108
			143	66	108
Difenacoum	[M – H] ⁺	443,2	293,0	33	90
			134,9	36	90
			142,9	55	90
Pindona (IS)	[M – H] ⁺	229,1	116,1	36	46
			144,0	25	46

con lo publicado por otros autores [12,17], aunque pueden existir amplias diferencias en función del lugar de procedencia de las aves y su patrón de hábitos diurno/nocturno [16,18]. No obstante, en función de los datos clínicos, hallazgos de necropsia y de la concentración encontrada solo se atribuyó la muerte por intoxicación por rodenticidas a uno de estos animales.

Se ha de reseñar, que de las 5 especies de aves rapaces estudiadas, la mayor frecuencia de detección la encontramos en las especies *Tyto alba* (lechuza; 85%) y *Accipiter nisus* (gavilán; 89%). Cuando estudiamos el patrón de comportamiento, observamos como las rapaces diurnas presentaron residuos de anticoagulantes en un 62% de los casos, mientras que en las nocturnas el porcentaje de aves positivas se elevó hasta un 78%. Si bien otros autores han descrito que en España es más frecuente la aparición de residuos en las aves nocturnas en nuestro estudio la frecuencia de casos positivos en estas nocturnas es mayor y en las aves diurnas casi duplica lo descrito en la Península Ibérica [16].

De los anticoagulantes incluidos en este estudio, no se detectaron en ninguna muestra el cumatrelalilo y la warfarina, ambos anticoagulantes de primera generación de uso cada vez más escaso en España. Los principios activos detectados en nuestro estudio fueron todos anticoagulantes de segunda generación o superwarfarinas (Figura 1). La bromadiolona fue el anticoagulante más frecuente y también el que alcanzó mayores concentraciones (37% de las aves, 87,7 ng/g de media), detectándose también el brodifacoum, difenacoum, clorofacinona y difetialona, si bien menos frecuentemente y a menor concentración (29%, 29,7 ng/g; 22,5%, 8,58 ng/g; 9%, 0,06 ng/g y 2,5%, 0,4 ng/g, respectivamente). Esta frecuencia de detección concuerda con la obtenida por otros autores en estudios llevados a cabo tanto en Europa como Norteamérica [5,12,17,18], lo que nos da una idea de la amplia comercialización a la que están sometidos estos principios activos, especialmente la bromadiolona y el brodifacoum. Analizando los resultados en función de la especie observamos que si bien las frecuencias de detección de los anticoagulantes son similares a las descritas por otros autores [5,16,18], las concentraciones medias de residuos en hígado que encontramos en las rapaces canarias son generalmente menores (Tabla 2).

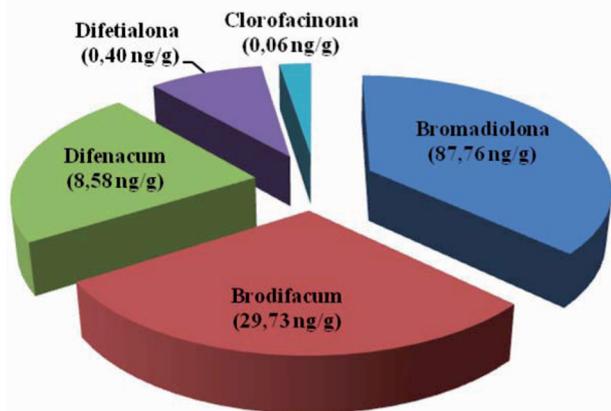


Figura 1. Distribución de los residuos de rodenticidas anticoagulantes encontrados en la muestra de aves rapaces estudiadas. El tamaño del segmento representa la frecuencia de detección (%) del anticoagulante. Dentro de cada sector se indica el valor medio \pm SD de la concentración encontrada.

Tabla 2. Valores de media, mediana, rango y porcentaje de detección de los anticoagulantes encontrados por especies. Los valores se expresan en ng/g de tejido hepático.

Especie	Bromadiolona	Brodifacoum	Difenacoum	Difetialona	Clorofacinona
<i>Asio otus</i> (n = 14)	84,4 \pm 128,4	14,5 \pm 23,5	1,2 \pm 2,9	N.D.	0,6 \pm 1,7
	0	0	0		0
	(0 - 279)	(0 - 68)	(0 - 10,6)		(0 - 6,5)
	33,3%	40%	20%		20%
<i>Falco tinnunculus</i> (n = 14)	117,0 \pm 183,6	75,5 \pm 191,3	10,6 \pm 38,7	N.D.	N.D.
	0	0	0		
	(0 - 516)	(0 - 701)	(0 - 145,17)		
	42,9%	42,9%	21,4%		
<i>Tyto alba</i> (n = 13)	169,2 \pm 156,9	29,0 \pm 42,7	19,9 \pm 57,2	1,8 \pm 0,1	N.D.
	184,83	0,79	0,2	0	
	(0 - 506)	(0 - 111)	(0 - 200,3)	(0 - 21,1)	
	84,6%	53,8%	46,2%	15,4%	
<i>Accipiter nisus</i> (n = 9)	13,9 \pm 0,5	4,5 \pm 7,9	4,9 \pm 9,2	N.D.	0,2 \pm 0,3
	0	0	0		0
	(0 - 33)	(0 - 23)	(0 - 28,2)		(0 - 0,78)
	44,4%	33,3%	44,4%		22,2%
<i>Falco peregrinoides</i> (n = 9)	10,8 \pm 32,5	N.D.	2,6 \pm 59,6	N.D.	0,1 \pm 0,4
	0		0		0
	(0 - 98)		(0 - 23,2)		1,18
	18,2%		9,1%		9,1%

Además encontramos que de forma muy frecuente las aves no presentaban únicamente residuos de un único principio activo sino que en un alto porcentaje de los casos se detectó más de un anticoagulante, tal y como ya ha sido descrito previamente [5,12,17,18]. De hecho del total de casos positivos de nuestro estudio en el 63% de las aves se detectaron dos o más residuos. Así, en el 31% de las aves se detectaron dos anticoagulantes; en el 10% tres anticoagulantes y en un 2% se detectaron residuos de hasta 4 anticoagulantes diferentes. Tal y como muestra la Figura 2, la mezcla

mas frecuentemente encontrada fue la de bromadiolona + brodifacoum (34,6%) seguida de la formada por bromadiolona + difenacoum (19,2%).

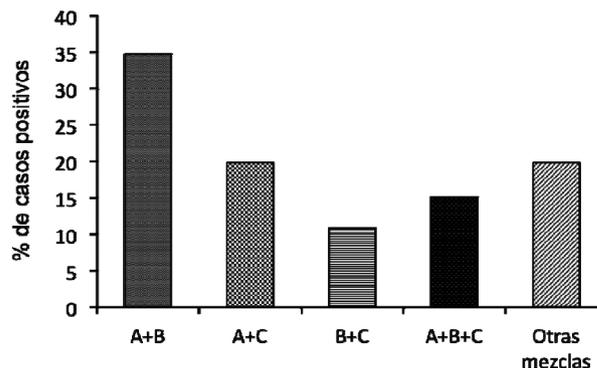


Figura 2. Combinación de anticoagulantes con mayor frecuencia. Mezclas de anticoagulantes más frecuentemente detectadas en las aves rapaces (A) Bromadiolona; (B) Brodifacoum; (C) Difenacoum

Centrándonos en el motivo de ingreso en el CRFS-Tafira, con independencia de si entraron vivos o habían sido hallados muertos, observamos que la causa principal con la que entran estos animales al centro es debido a politraumatismo por colisión (55%). Nos llamó mucho la atención que de este subgrupo de animales la mayoría presentó residuos detectables de anticoagulantes (75%). Teniendo en cuenta estos resultados parece deducirse que, independientemente de la causa de muerte, el hallar residuos de uno o más anticoagulantes, predispone a estos animales a sufrir alteraciones del comportamiento o favorecer la instauración de enfermedades y, secundariamente, aumentar la incidencia de accidentes que haga que aumente su morbilidad/mortalidad.

Un dato que llamó nuestra atención fue que una de las especies en la que mas frecuentemente se detectaron residuos de anticoagulantes fue el gavilán (*Accipiter nisus*) ya que esta ave tiene un patrón de alimentación principalmente ornitófago. Esto indica que los anticoagulantes que han sido ingeridos por estas rapaces provenían de otras aves, que serían las que habían consumido el cebo con anticoagulantes. Este es un dato muy preocupante ya que en ningún caso las aves son la especie de destino de los cebos rodenticidas, e implica que estos han sido colocados en el medio natural de forma fácilmente accesible para estas.

Aún siendo un estudio que abarca toda la Comunidad Autónoma de Canarias, más de 75% de las muestras provienen de la isla de Gran Canaria, seguida de Fuerteventura y la Gomera con un 8,3% y por último Lanzarote y el Hierro con 3,3%. Si analizamos los datos por isla, nos encontramos como en la isla de Gran Canaria el 70,2% de los animales eran positivos y casi en el 50% se detectaron dos o más anticoagulantes. De los animales provenientes de Fuerteventura solo en 20% fue positivo y a un único anticoagulante (bromadiolona). Todos los animales de Lanzarote fueron positivos y a dos o más anticoagulantes. De las aves remitidas por la Gomera el 80% eran positivos y en el 20% de ellos se detectaron varios anticoagulantes. De la isla de El Hierro el 50% de los casos fueron positivos y ninguno de ellos presentó más de un anticoagulante en su hígado. Estos resultados, si bien no hemos recibido ninguna muestra de las islas de La Palma y Tenerife, podemos concluir que el empleo de rodenticidas anticoagulantes en el medio natural de Canarias es un práctica habitual, que además es incentivada desde las Administraciones Públicas de la Comunidad Autónoma [8].

Este estudio pone de manifiesto que el uso de rodenticidas en el medio natural para el control de plagas de roedores implica que estos productos pasan a la cadena trófica, afectando así a especies de fauna silvestre. No es descartable que la exposición constante de estos animales a niveles bajos de estos productos pueda deteriorar su estado de salud [10,12], representando por consiguiente una amenaza para el grado de conservación de estas especies. Consideramos de vital importancia que los resultados de este estudio sean tenidos en cuenta por los responsables de la Administración para que se aseguren de que se realiza una correcta aplicación de estos productos tan tóxicos en el medio natural, utilizando en todos los casos estaciones de cebo [9] con el fin de poder compatibilizar el control de plagas con la preservación de la biodiversidad.

Agradecimientos

El presente estudio se ha realizado gracias a la colaboración del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira (Cabildo de Gran Canaria). El primer autor se encuentra realizando su tesis doctoral con una beca de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (B.O.U.L.P.G.C. nº 4, 2010). Agradecemos la colaboración de D^a Marta Sangil Monroy y D^a M^a de los Reyes Suárez Hanna su colaboración en la elaboración de este trabajo y en la preparación del manuscrito.

Bibliografía

- Colazo R, Castro J (1997) Los roedores dañinos: algunos aspectos del control químico y bacteriológico. *Rev Invest Pecuarias* 8:1-9.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3:757-771.
- Collins FM (1996) Pasteurella, Yersinia, and Francisella, En: Baron S (ed) *Medical Microbiology*, Galveston (TX).
- Schelotto F, Hernández E, González S, Del Monte A, Ifran S, Flores K, Pardo L, Parada D, Filippini M, Balseiro V, Geymonat JP, Varela G (2012) A ten-year follow-up of human leptospirosis in Uruguay: an unresolved health problem. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 54.
- Stone WB, Okoniewski JC, Stedelin JR (2003) Anticoagulant rodenticides and raptors: recent findings from New York, 1998-2001. *Bull Environ Contam Toxicol* 70:34-40.
- Murphy MJ (2007) Anticoagulant rodenticides, En: Gupta RC (ed) *Veterinary toxicology*. Academic Press, New York.
- Pelfrène AF (2010) Rodenticides, En: Krieger R (ed) *Handbook of pesticide toxicology*, 3er edition.
- Boletín Oficial de la Provincia de Las Palmas - 25 de febrero (2011) Convocatoria para el año 2011 de entrega de productos raticidas por la Consejería de vivienda y arquitectura, agricultura, ganadería y pesca, y aguas del Cabildo de Gran Canaria.
- Rando JC Delegación Territorial en Canarias de SEO/Birdlife (2012) Correcto uso de productos rodenticidas en espacios abiertos. http://www.venenono.org/wp-content/uploads/2012/04/manual_manejo_raticidas.pdf.
- Cox P, Smith RH (1992) rodenticide ecotoxicology pre-lethal effects of anticoagulants on rat behavior. Fifteenth Vertebrate Pest Conference <http://digitalcommons.unl.edu/vpc15/86/>.
- Dowding CV, Shore RF, Worgan A, Baker PJ, Harris S (2010) Accumulation of anticoagulant rodenticides in a non-target insectivore, the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Environ Pollut* 158:161-166.
- Albert CA, Wilson LK, Mineau P, Trudeau S, Elliott JE (2010) Anticoagulant rodenticides in three owl species from Western Canada, 1988-2003. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:451-459.
- Elmeros M, Christensen TK, Lassen P (2011) Concentrations of anticoagulant rodenticides in stoats *Mustela erminea* and weasels *Mustela nivalis* from Denmark. *Sci Total Environ* 409:2373-2378.
- Lambert O, Pouliquen H, Larhantec M, Thorin C, L'Hostis M (2007) Exposure of raptors and waterbirds to anticoagulant rodenticides (difenacoum, bromadiolone, coumatetralyl, coumatfen, brodifacoum): epidemiological survey in Loire Atlantique (France). *Bull Environ Contam Toxicol* 79:91-94.
- Soler-Rodríguez F, Oropesa-Jiménez AL, Pérez-López M (2006) Análisis de los envenenamientos en fauna silvestre. Situación en Extremadura. *Rev Toxicol* 23:35-38.
- Sanchez-Barbudo IS, Camarero PR, Mateo R (2012) Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *Sci Total Environ* 420:280-288.
- Thomas PJ, Mineau P, Shore RF, Champoux L, Martin PA, Wilson LK, Fitzgerald G, Elliott JE (2011) Second generation anticoagulant rodenticides in predatory birds: Probabilistic characterisation of toxic liver concentrations and implications for predatory bird populations in Canada. *Environ Int* 37:914-920.
- Walker LA, Turk A, Long SM, Wienburg CL, Best J, Shore RF (2008) Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Sci Total Environ* 392:93-98.
- Stone WB, Okoniewski JC, Stedelin JR (1999) Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *J Wildl Dis* 35:187-193.
- Lorenzo JA (2007) Atlas de las aves nidificantes en el archipiélago canario. Editorial Ministerio de Medioambiente.
- Fisher P, O'Connor C, Wright G, Eason CT (2003) Persistence of four anticoagulant rodenticides in the livers of laboratory rats. *D O C S C I E N C E I N T E R N A L S E R I E S* <http://www.conservation.org.nz/upload/documents/science-and-technical/dsis139.pdf>.
- Fournier-Chambrillon C, Berny PJ, Coiffier O, Barbedienne P, Dasse B, Delas G, Galineau H, Mazet A, Pouzenc P, Rosoux R, Fournier P (2004) Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implications for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *J Wildl Dis* 40:688-695.

Intoxicaciones intencionadas y accidentales de fauna silvestre y doméstica en España: diferencias entre Comunidades Autónomas

Sánchez-Barbudo IS, Camarero PR y Mateo R*

Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), CSIC-UCLM-JCCM, Ronda de Toledo s/n, 13071 Ciudad Real.

Recibido 3 de mayo de 2012 / Aceptado 17 de noviembre de 2012

Resumen: En este estudio se han analizado 1.157 casos sospechosos de intoxicación de fauna silvestre y doméstica en el medio natural (1.800 animales y 340 cebos) procedentes de diversas Comunidades Autónomas (CCAA) españolas durante el periodo 2004-2010. Se ha detectado un 41,2% de casos positivos (40,8% de animales y 52,6% de cebos). En los carnívoros domésticos la detección del tóxico llegó al 71,4%, lo que indica su utilidad como centinelas del uso de veneno en el medio natural. El 78,3% de los animales que fueron positivos a los análisis toxicológicos han sido considerados como intoxicaciones intencionadas. Las aves rapaces diurnas fueron el grupo más afectado por las intoxicaciones (43,6% del total de animales positivos), seguido de los mamíferos carnívoros (27,1%). Los tóxicos más frecuentemente detectados fueron insecticidas anticolinesterásicos (cebos/animales: 80,4%/65,8%), seguidos de rodenticidas anticoagulantes (5%/19,6%), estricnina (2,2%/6,5%) y arsénico (4,5%/2,3%). De las diferencias observadas entre CCAA destaca la preponderancia en el uso de estricnina en Asturias, rodenticidas anticoagulantes en Castilla y León, insecticidas organofosforados en Aragón, insecticidas carbamatos en Castilla-La Mancha y Madrid, y la aparición de otros venenos, como α -cloralosa o barbitúricos, en Cataluña. En resumen, el 82,3% de las intoxicaciones intencionadas fueron debidas a anticolinesterásicos y el 85,5% de las accidentales a rodenticidas anticoagulantes. En futuras regulaciones de plaguicidas y biocidas se debería tener en cuenta el riesgo del uso ilegal en la preparación de cebos envenenados que comporta la comercialización de formulados con alta riqueza de ingredientes activos con baja DL₅₀.

Palabras clave: veneno, toxicovigilancia, biodiversidad, caza, ganadería.

Abstract: Intentional and accidental poisoning of wild and domestic animals in Spain: differences between regions. In this study we have analyzed 1,157 suspected cases of poisoning of wild and domestic animals in the natural environment (1,800 animals and 340 baits) from different Spanish regions during the period 2004-2010. We detected 41.2% of positive cases (40.8% of animals and 52.6% of baits). In domestic carnivores detection of toxic compounds reached 71.4%, indicating its usefulness as sentinels of the use of poison in the environment. In those animals positive for toxicological analysis, 78.3% have been considered as intentional poisonings. The diurnal raptors were most affected by poisoning (43.6% of positives), followed by carnivorous mammals (27.1%). The most frequently detected toxicants were anticholinesterase insecticides (baits/animals: 80.4%/65.8%), followed by anticoagulant rodenticides (5%/19.6%), strychnine (2.2%/6.5%) and arsenic (4.5%/2.3%). The differences observed between regions underlines the dominance in the use of strychnine in Asturias, anticoagulant

rodenticides in Castilla y Leon, organophosphate insecticides in Aragon, carbamate insecticides in Castilla-La Mancha and Madrid, and the emergence of other poisons, such as α -chloralose or barbiturates, in Catalonia. In summary, 82.3% of intentional poisonings were due to anticholinesterase pesticides and 85.5% of accidental anticoagulant rodenticides. Future regulations of pesticides and biocides should take into account the risk of illegal use in the preparation of poisoned baits which involves the marketing of formulations with high richness of active ingredients with low LD₅₀.

Key words: poison, toxicovigilance, biodiversity, hunting, livestock.

Introducción

España es el país europeo con mayor diversidad en flora y fauna debido a las condiciones especiales de orografía, extensión y situación geográfica, albergando más del 80% del total de especies de plantas vasculares presentes en Europa y más del 50% de las especies animales. Entre estos se encuentra la mayor variedad de mamíferos y reptiles y ocupa el tercer puesto en diversidad de anfibios y peces [1]. Pero en las últimas décadas esta riqueza natural se está viendo afectada por factores muy variados y comunes al resto de los países del mundo [2,3]. Una de las causas de mortalidad, tanto de fauna silvestre como doméstica, más preocupantes es el uso de plaguicidas, cuya casuística se ha recogido en estudios realizados en diversos países [2,4-26]. Estas intoxicaciones pueden deberse a accidentes tras un buen uso de los plaguicidas, a abusos o al uso ilegal de dichos productos como venenos [14,26-28]. Las intoxicaciones debidas a un uso legal y adecuado de plaguicidas son escasas, aunque se recogen algunos casos en la bibliografía [5,29-33]. También se han descrito intoxicaciones debido a un uso legal pero inadecuado de plaguicidas, principalmente producidos por excesivas concentraciones [10,34-36]. La mayoría de las intoxicaciones se producen por la utilización ilegal de venenos por medio de la colocación de cebos envenenados con el fin de matar animales [2,6,8,18,23,24,37-40] y casi siempre relacionados con los daños ocasionados por los animales silvestres en las cosechas, el ganado o la caza [27]. Además, debido a la existencia de cadáveres de animales intoxicados en el campo por las causas descritas anteriormente se producen intoxicaciones secundarias como consecuencia de su ingestión por parte de animales necrófagos [7,8,16,18,33,37].

Los insecticidas anticolinesterásicos, seguidos de los rodenticidas anticoagulantes son los tóxicos más frecuentemente implicados en las intoxicaciones de fauna silvestre [25,26,28], pero la familia y tóxico más utilizado varía en función del país de estudio [9,15,20,21,26,41]. Por otra parte, la existencia en el mercado de formulados de plaguicidas con principios activos de muy baja DL₅₀ y con riquezas de

*e-mail: Rafael.Mateo/uclm.es

dicho principio activo elevadas favorece que sean usados como veneno para intoxicar intencionadamente animales domésticos y silvestres [25].

En este artículo se recoge una revisión de los casos enviados al Laboratorio de Toxicología del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC) desde diversas Comunidades Autónomas (CCAA) de España para el estudio de envenenamientos de fauna silvestre y doméstica en el periodo 2004-2010, así como la determinación de la intencionalidad de los casos diagnosticados como positivos.

Material y métodos

Muestras recibidas

En el IREC se han analizado en el periodo 2004-2010 un total de 1.157 casos enviados para el diagnóstico de envenenamiento de fauna silvestre y doméstica por distintas CCAA, agentes medioambientales, centros de recuperación de fauna silvestre u organizaciones no gubernamentales (ONGs) de Andalucía (n=5), Aragón (n=324), Asturias (n=64), Cantabria (n=8), Castilla y León (n=44), Castilla-La Mancha (n=490), Cataluña (n=93), Extremadura (n=5), Madrid (n=107), Melilla (n=2), Navarra (n=10), País Vasco (n=4) y anecdóticamente un caso de Portugal. Se puede observar una gran diferencia en el volumen de casos enviados por las distintas CCAA debido a que el Laboratorio de Toxicología del IREC ofrece un servicio de análisis toxicológico mediante contratos establecidos a lo largo de los años con Aragón, Asturias, Cantabria, Castilla-La Mancha, Cataluña, Madrid, Navarra y País Vasco desde su apertura en 2004 y que aportan el 95,1% de los casos de este estudio (n=1.100). Como consecuencia, se ha producido un aumento progresivo desde el año 2004 hasta 2007, y posteriormente una estabilización de los casos enviados, debido a que no se han establecido contratos con nuevas CCAA. Además, se produjo un importante aumento en el año 2007 debido al envío de muestras procedentes de Castilla y León con el fin de determinar si el tratamiento realizado contra una plaga de topillo campesino (*Microtus arvalis*) estaba afectando a otras especies no diana encontradas muertas en los campos tratados.

Los casos recibidos se correspondieron con un total de 1.800 animales, de los cuales 42,5% pertenecían al grupo de las rapaces (n=765), 26,6% a los mamíferos (n=478), 0,1% a reptiles (n=2) y 30,8% a otras especies (n=555). Las muestras se remitieron como animales enteros o bien como vísceras (principalmente hígado) y contenido gástrico de animales sometidos a necropsia en los centros de recuperación de fauna silvestre de las distintas CCAA. Entre las muestras remitidas se encontraban 341 cebos, de los cuales, 187 se enviaron junto a animales supuestamente envenenados (n=291).

Procedimientos analíticos

En los casos en que la sintomatología o los hallazgos de necropsia indicaron que el animal había muerto de forma aguda se realizó un examen visual de la muestra de contenido gástrico para detectar la presencia de formulados granulados u otro signo de presencia de fitosanitarios. Esto también se llevó a cabo con los cebos. En caso de encontrar restos sospechosos (p.e. microgranulados de plaguicidas), se realizó una extracción directa de 0,002 g con 0,5 ml de acetato de etilo y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en las condiciones descritas posteriormente. En el caso de no encontrar material sospechoso en las muestras examinadas, y en base a los signos hallados en la necropsia descritos

por los veterinarios, se realizaron tres tipos de análisis diferentes con el fin de detectar (1) estricnina, plaguicidas anticolinesterásicos, organoclorados, piretroides y otros neurotóxicos de acción aguda como α -cloralosa y barbitúricos [42], (2) rodenticidas anticoagulantes [43] y (3) metales pesados y metaloides [44].

La determinación de compuestos neurotóxicos de acción aguda se llevó a cabo mediante el método descrito por Brown y col. [42], con algunas modificaciones. De esta forma, se procedió al homogeneizado de 1 g de muestra (contenido gástrico, hígado o cebo) en mortero con 10 g de sulfato sódico anhidro (Prolabo, Leuven, Bélgica). A continuación, el homogeneizado se vertió en un tubo de 30 ml con tapón de teflón y se le añadió 15 ml de diclorometano (HiperSolv Cromanorm Gradient grade, Prolabo, Leuven, Bélgica) y una vez herméticamente cerrado se mantuvo en agitación horizontal durante 10 minutos y sonicación durante 5 minutos. El extracto se filtró a través de papel de filtro sobre un matraz de corazon de 100 ml. Esta extracción se repitió con otros 10 ml de diclorometano añadidos sobre el residuo sólido restante y el sobrenadante obtenido se combinó con el anterior y se llevó a sequedad en rotavapor (Büchi, Flawil, Suiza) a 400 mbar y 40°C. El extracto seco se resuspendió en 0,5 ml de una mezcla de acetato de etilo:ciclohexano (1:1, v/v) (Suprasolv, Merck, Darmstadt, Alemania). La purificación se hizo mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) a presión atmosférica en columnas de vidrio con diámetro interno de 17,25 mm y longitud de 43,5 cm de relleno Bio-Beads S-X3 (Bio-Rad Laboratories; Madrid, España) como fase estacionaria y acetato de etilo:ciclohexano (1:1 v/v) como fase móvil. Se recogieron las fracciones de la GPC correspondientes a 55-60 ml y 60-90 ml (ambas fracciones para el análisis de plaguicidas) y se llevaron a sequedad con rotavapor. Ambas fracciones se resuspendieron en 0,5 ml de acetato de etilo y se distribuyeron en viales para cromatografía de 2 ml. El análisis se realizó mediante cromatografía de gases (6890N Network CG System, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) acoplada a detector de masas selectivo (GC-MS) con cuadrupolo simple e ionización por impacto electrónico (5973 Network Mas Selective Detector). Las condiciones cromatográficas se controlaron usando el software MSD Chem Station versión D.01.00 (Agilent Technologies). Las columnas de gases utilizadas fueron del tipo 5% fenilpolisiloxano (30 m x 0,32 mm de longitud x diámetro interno, 0,25 μ m de tamaño de partícula; HP5MS, Agilent Technologies; BPX5, SGE; TR-5MS, Thermo Scientific). La velocidad de flujo de He fue de 34,9 ml/min. El volumen de inyección fue de 1 μ l en modo "splitless" y las condiciones del inyector fueron de 280°C de temperatura y 31,5 Kpa de presión. Las condiciones del horno de columna fueron de 50°C de temperatura inicial con una rampa de 5°C/min hasta 310°C (durante 60 minutos). La fuente del espectrómetro de masas se mantuvo a 230°C y el voltaje a 70 V. La identificación de los compuestos se realizó usando el tiempo de retención y el espectro de masas característico de cada compuesto estudiado. Los patrones analíticos fueron obtenidos a concentraciones de 10-100 μ g/ml de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania) y a partir de ellos se realizaron curvas de calibración a un rango de concentraciones 0,04-2,5 μ g/ml en acetato de etilo. El coeficiente lineal de correlación se obtuvo usando el área de los iones mayoritarios de cada compuesto. El porcentaje de recuperación de los compuestos determinados se hizo con hígado (1 g, n=4) fortificado con 2,5 μ g/g de cada patrón y procesado según el procedimiento descrito anteriormente para las muestras. El porcentaje de recuperación fue >70% para aldicarb, metamidofós, mevinfós, 1-naftalenol, metiocarb, aprocarb, dimetoato, carbofurano, diazinón,

metil-paratión, etil-paraoxón, malatión, clorpirifós, fentión, paratión, metil-bromofós, clofenvinfós, etil-bromofós, fenamifós, etión, tetrametrín, fenotrín, permetrín, α -cipermetrín, fenvalerato y deltametrín, y >50% para diclorofós, bendiocarb, demeton-s-metil, disulfotón, benfuracarb y ciflutrín. Debido a su baja estabilidad térmica, la identificación de aldicarb se realizó mediante la comparación con el espectro del aldicarb-nitrilo obtenido de su descomposición por GC-MS a partir de la inyección de un patrón analítico [45].

Aunque mediante el método anteriormente descrito es posible determinar la presencia de estricnina en la fracción de 55-60 ml de la GPC, se llevó a cabo también una extracción selectiva basada en el método de Stas-Otto para alcaloides [42]. Para esta determinación se utilizó una alícuota de 5 ml del extracto obtenido con el método anterior separada justo antes de la purificación por GPC. En su lugar, dicha alícuota fue evaporada hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno obtenido con un generador de nitrógeno NM30LA 230Va (Peak Scientific, Inchinnan, Escocia), se resuspendió con 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 N y se extrajo con 1,5 ml de diclorometano durante 10 minutos en agitación horizontal y posterior centrifugado a 2.026 g durante 5 minutos. La fase acuosa superior fue separada y alcalinizada hasta pH=11 con hidróxido sódico 6 N y fue sometida a una nueva partición con 2,5 ml de diclorometano. La fase orgánica inferior fue la recuperada en este caso, filtrada a través de sulfato sódico anhidro, evaporada bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad y finalmente resuspendida en 0,3 ml de tolueno. El análisis se realizó mediante CG-MS en las mismas condiciones que en el análisis descrito anteriormente.

Para la determinación de rodenticidas anticoagulantes se utilizó el método analítico de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) con el método descrito por Sánchez-Barbudo y col. [43].

El análisis de metales pesados (principalmente plomo) y metaloides (principalmente arsénico) se llevó a cabo por absorción atómica en cámara de grafito (GF-AAS) [44].

Análisis de los datos

La intencionalidad de la intoxicación se ha establecido en función de la concentración del tóxico detectado, por su estado actual en el registro de productos autorizados como plaguicidas o biocidas, por la información recogida en el campo por los agentes medioambientales, por la sintomatología y los hallazgos de necropsia aportados por los veterinarios, y finalmente evaluando toda esa información junto con los mecanismos de acción y toxicidad de los productos detectados. Es decir, una concentración elevada de una sustancia prohibida en la actualidad en una zona con un historial de uso de cebos envenenados, produciendo un cuadro agudo en los animales muertos, y siendo la sustancia detectada de rápida acción y elevada toxicidad sería considerado el caso como claramente de un envenenamiento intencionado. Un ejemplo de este tipo de intoxicación intencionada sería el producido por la estricnina. En el otro extremo, la detección de un plaguicida o biocida en uso para el que los animales han podido tener una vía de exposición accidental a cantidades suficientemente letales (aunque no anormalmente elevadas) podrían ser considerados como casos de intoxicación accidental. Un ejemplo de esto último serían los casos producidos por los rodenticidas anticoagulantes. Los porcentajes de aparición, positividad o intencionalidad de los diferentes tóxicos fueron comparados entre CCAA, grupos de animales y/o grupos de tóxicos mediante pruebas de χ^2 , con la corrección de Yates en las tablas de contingencia de 2 x 2. El nivel de

significación de las pruebas se estableció en $p < 0,05$. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el programa IBM SPSS Statistics versión 19.

Resultados

Se ha detectado un 41,2% de casos positivos distribuidos por las distintas zonas de estudio (Figura 1). En cuanto al número de cebos analizados, el 52,6% fueron positivos a los análisis realizados, con variaciones en las CCAA mejor monitorizadas entre el 31,0% de Aragón y el 70,0% de Asturias, si bien las diferencias no fueron significativas ($\chi^2_9=13,7$, $p=0,135$). Los cebos positivos ($n=179$) han sido restos animales, carne o derivados ($n=136$), grano ($n=6$), huevos ($n=5$), pescado ($n=2$), pan ($n=2$), tortilla ($n=1$) y queso ($n=1$). En algunos casos la muestra remitida ha sido un producto químico sospechoso o un material que ha podido estar en contacto con los cebos ($n=26$). Con respecto a los animales analizados, el 40,8% han sido positivos, y también con variaciones entre el 31,3% de Aragón y el 50,0% de Asturias (Tabla 1), siendo estas diferencias significativas ($\chi^2_{12}=54,3$, $p < 0,001$). El 78,3% de los animales analizados que han resultado positivos a los análisis toxicológicos han sido considerados como intoxicaciones intencionadas. El restante 21,7% pueden considerarse intoxicaciones accidentales debidas al uso legal de plaguicidas o biocidas (Tabla 1). Se han observado diferencias en la intencionalidad de los envenenamientos entre CCAA ($\chi^2_{11}=351$, $p < 0,001$). Destaca el dato de Castilla y León en el que el 94,6% de las intoxicaciones han sido accidentales a consecuencia de que la mayor parte de las muestras remitidas han estado relacionadas con el uso de rodenticidas anticoagulantes durante una plaga de topillo campesino ocurrida en 2007 (Figuras 1 y 2).

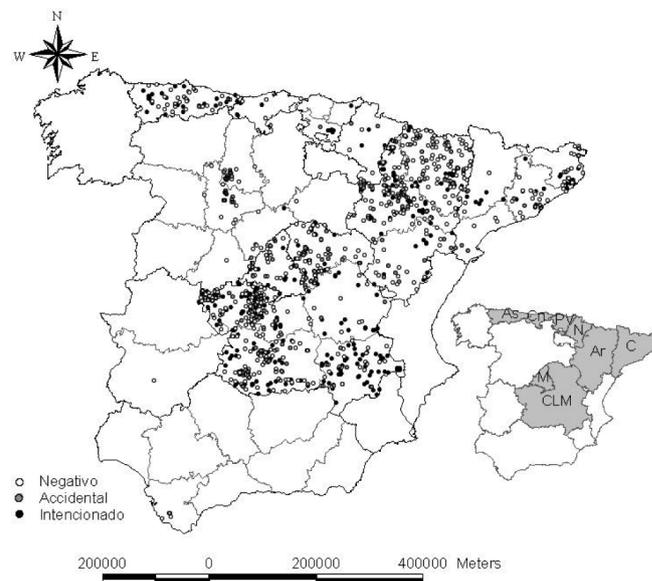


Figura 1. Distribución de los casos (incidentes) investigados de posibles intoxicaciones en fauna silvestre y doméstica con resultados analíticos negativos o positivos. Los casos positivos han sido clasificados como intoxicaciones intencionadas o accidentales. En el mapa pequeño aparecen sombreadas las Comunidades Autónomas de las que se reciben de forma rutinaria en el IREC casos de posible intoxicación de fauna silvestre y doméstica para llevar a cabo los análisis toxicológicos correspondientes (As: Asturias, Cn: Cantabria, PV: País Vasco, N: Navarra, Ar: Aragón, C: Cataluña, M: Madrid, CLM: Castilla-La Mancha).

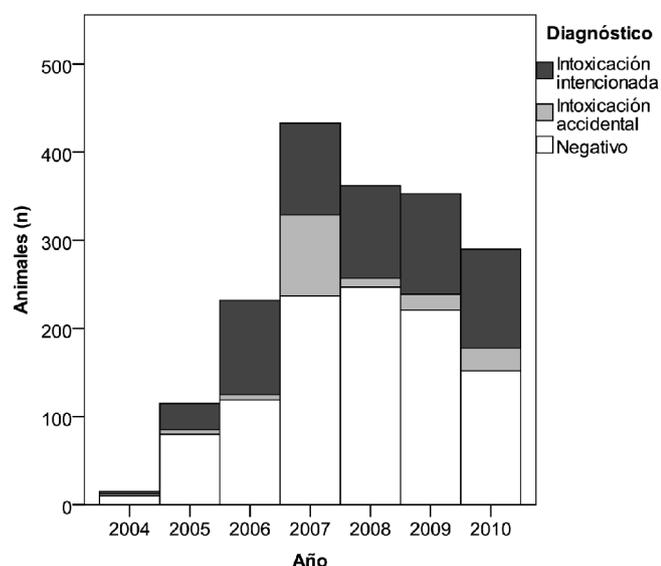


Figura 2. Evolución del número de animales investigados en casos de posibles intoxicaciones en fauna silvestre y doméstica con resultados analíticos negativos o positivos entre 2004 y 2010 en España. Los animales positivos han sido clasificados como afectados por intoxicaciones intencionadas o accidentales.

Las aves rapaces diurnas fueron el grupo más afectado por las intoxicaciones, encontrándose el 43,6% de los animales positivos dentro de este grupo, seguido de los mamíferos carnívoros silvestres y domésticos con un 27,1%. Dentro de dichos grupos se obtienen también los mayores porcentajes de positividad en los análisis, con un 43,5% y 54,2%, respectivamente (Tabla 2). Se han observado diferencias en la positividad de los resultados entre grupos animales ($\chi^2_{10}=81,5$, $p<0,001$). Cabe destacar que en los carnívoros domésticos se ha detectado con mayor frecuencia una sustancia tóxica (71,4%) que en los carnívoros silvestres (43,6%) ($\chi^2=25,9$, $p<0,001$), lo que indica que perros y gatos pueden ser buenos centinelas del uso de veneno en el medio natural. También existen diferencias en la intencionalidad de las intoxicaciones entre grupos animales ($\chi^2_8=131,5$, $p<0,001$). Los depredadores presentan también los mayores porcentajes de intencionalidad de la intoxicación, con el 91,3% en las rapaces diurnas y el 84,4% en los mamíferos carnívoros (considerando en conjunto de carnívoros silvestres y domésticos), mientras que las rapaces nocturnas presentan el valor más bajo (20%) al ser más vulnerables a las intoxicaciones secundarias accidentales por rodenticidas anticoagulantes ($\chi^2_2=46,9$, $p<0,001$) (Tabla 2).

Tabla 1. Resultados de los análisis toxicológicos de cebos y animales remitidos al IREC entre 2004 y 2010 de diferentes Comunidades Autónomas de España e intencionalidad de las intoxicaciones.

Comunidad Autónoma	Cebos analizados			Animales analizados			Tipo de intoxicación ^a			
	n	Positivos		n	Positivos		Intencionada		Accidental	
		n	%		n	%	n	%	n	%
Andalucía	1	0	0,0	4	0	0,0	-		-	
Aragón	29	9	31,0	431	135	31,3	108	80,0	27	20,0
Asturias	10	7	70,0	74	37	50,0	35	94,6	2	5,4
Cantabria	4	1	25,0	7	3	42,9	3	100	0	0,0
Castilla y León	3	1	33,3	150	92	61,3	5	5,4	87	94,6
Castilla-La Mancha ^b	255	137	53,7	822	355	43,2	329	92,7	26	7,3
Cataluña	18	12	66,7	158	54	34,2	48	88,9	6	11,1
Extremadura				12	3	25,0	3	100	0	0,0
Madrid	17	9	52,9	126	48	38,1	38	79,2	10	20,8
Melilla ^c				2	1	50,0	0	0,0	1	100
Navarra	1	1	100	11	5	45,5	5	100	0	0,0
País Vasco	2	2	100	3	1	33,3	1	100	0	0,0
Total	340	179	52,6	1800	734	40,8	575	78,3	159	21,7

^aSobre el número de animales positivos.

^bIncluido un perro (*Canis familiaris*) de caza intoxicado en un viaje a Portugal

^cUna culebra de herradura (*Hemorrhois hippocrepis*) y una garcilla bueyera (*Bubulcus ibis*) recogidas en las Islas Chafarinas.

Tabla 2. Resultados de los análisis toxicológicos realizados a los diferentes taxones de animales remitidos al IREC entre 2004 y 2010, contribución de cada grupo al total de animales positivos e intencionalidad de las intoxicaciones.

Grupo animal	Analizados (n=1800)	Positivos (n=734)			Tipo de intoxicación			
		n	%Pos ^a	%An ^b	Intencionada (n=575)		Accidental (n=159)	
n	%				n	%	n	%
Crustáceos^c	2	1	50,0	0,1	0	0,0	1	100
Peces	5	0	0,0	0,0	-	-	-	-
Anfibios	9	0	0,0	0,0	-	-	-	-
Reptiles	20	3	15,0	0,4	2	66,7	1	33,3
Aves	1286	500	38,9	68,1	382	76,4	118	23,6
Rapaces diurnas	735	320	43,5	43,6	292	91,3	28	8,7
Rapaces nocturnas	30	10	33,3	1,4	2	20,0	8	80,0
Otras aves	521	170	32,6	23,2	88	51,8	82	48,2
Mamíferos	478	230	48,1	31,3	191	83,0	39	17,0
Carnívoros silvestres	227	99	43,6	13,5	73	73,7	26	26,3
Carnívoros domésticos ^d	140	100	71,4	13,6	95	95,0	5	5,0
Otros mamíferos	111	31	27,9	4,2	23	74,2	8	25,8

^aPorcentaje de positivos con respecto a los analizados en cada grupo animal.

^bPorcentaje de animales positivos en cada grupo con respecto del total de positivos.

^cCangrejos de río.

^dDentro de estos carnívoros domésticos se analizaron 115 perros y 25 gatos domésticos (*Felis catus*), de los cuales 80 y 20 fueron positivos al análisis toxicológico, respectivamente.

Tabla 3. Tipos de tóxicos detectados en los análisis toxicológicos de cebos y animales remitidos al IREC entre 2004 y 2010, contribución de cada grupo al total de animales positivos e intencionalidad de las intoxicaciones producidas por cada grupo de tóxicos.

Uso/Familia o producto	Cebos positivos (n=179)		Animales positivos (n=734)		Tipo de intoxicación ^a					
	N	%Ce ^b	n	%An ^b	Intencionada (n=575)			Accidental (n=159)		
					n	%Int ^c	%An ^b	n	%Acc ^c	%An ^b
Insecticidas	148	82,7	503	68,5	488	97,0	84,9	15	3,0	9,4
Carbamatos	104	58,1	352	48,0	346	98	60,2	6	1,7	3,8
Organofosforados	40	22,3	131	17,8	127	96,9	22,1	4	3,1	2,5
Organoclorados	4	2,2	19	2,6	15	78,9	2,6	4	21,1	2,5
Piretroides	0	0,0	1	0,1	0	0,0	0,0	1	100	0,6
Rodenticidas	17	9,5	199	27,1	63	31,7	11,0	136	68,3	85,5
Indandionas	1	0,6	82	11,2	4	4,9	0,7	78	95,1	49,0
Cumarinas	9	5,0	62	8,4	4	6,5	0,7	58	93,5	36,5
Estricnina	4	2,2	48	6,5	48	100	8,3	0	0,0	0,0
α-Cloralosa	3	1,7	7	1,0	7	100	1,2	0	0,0	0,0
Metales y metaloides	8	4,5	25	3,4	17	68,0	3,0	8	32,0	5,0
Arsénico	8	4,5	17	2,3	17	100	3,0	0	0,0	0,0
Plomo	0	0,0	8	1,1	0	0,0	0,0	8	100	5,0
Fármacos										
Barbitúricos	2	1,1	4	0,5	4	100	0,7	0	0,0	0,0
Molusquicidas										
Metaldehído	3	1,7	3	0,4	3	100	0,5	0	0,0	0,0
Fungicidas										
Fenilamidas	1	0,6	0	0,0	-	-	-	-	-	-

^aSobre el número de animales positivos.

^bContribución en porcentaje de dicho grupo de tóxicos en el total de cebos o animales positivos en cada columna.

^cPorcentaje de animales intoxicados de forma intencionada o accidental para cada tipo de tóxico.

Los grupos de tóxicos más frecuentemente detectados en los cebos ($n=179$) y los animales intoxicados ($n=734$) fueron los insecticidas anticolinesterásicos (carbamatos y organofosforados: 80,4% en cebos y 65,8% en animales), seguidos de los rodenticidas anticoagulantes (cumarinas e indandionas: 5% en cebos y 19,6% en animales), la estricnina (2,2% en cebos y 6,5% en animales) y el arsénico (4,5% en cebos y 2,3% en animales) (Tabla 3). Entre las diferentes CCAA hubo diferencias entre los grupos de tóxicos detectados, tanto en cebos ($\chi^2_{80}=382$, $p<0,001$; Figura 3) como en animales ($\chi^2_{132}=1409$, $p<0,001$; Figura 4), destacando la preponderancia de la estricnina en cebos y animales de Asturias, los rodenticidas anticoagulantes en los animales de Castilla y León, los insecticidas organofosforados en los animales de Aragón, los insecticidas carbamatos en cebos y animales de Castilla-La Mancha y Madrid y la aparición de otros venenos, como la α -cloralosa o los barbitúricos, en los cebos y animales de Cataluña (Figura 3). Mientras que las intoxicaciones por insecticidas anticolinesterásicos y organoclorados, estricnina, α -cloralosa, arsénico, barbitúricos y metaldérido fueron generalmente intencionadas (>79%), las intoxicaciones por rodenticidas anticoagulantes y plomo fueron accidentales (>93%) ($\chi^2_{12}=632$, $p<0,001$; Tabla 3). El 82,3% de las intoxicaciones intencionadas fueron debidas a anticolinesterásicos y el 85,5% de las accidentales lo fueron por rodenticidas anticoagulantes (Tabla 3).

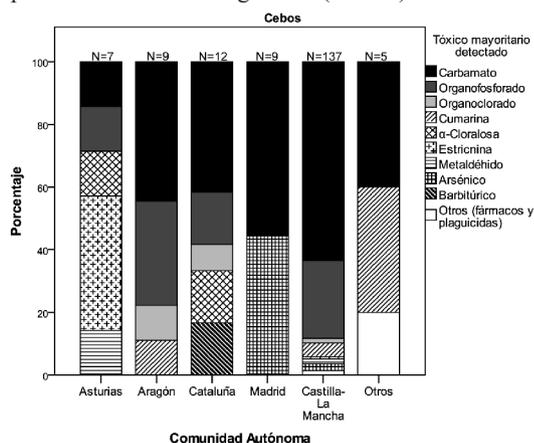


Figura 3. Porcentaje de la aparición de diferentes tipos de tóxicos en cebos implicados en intoxicaciones en fauna silvestre y doméstica de diferentes Comunidades Autónomas de España entre 2004 y 2010.

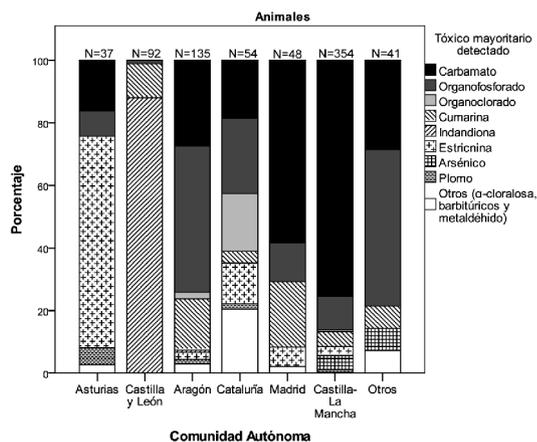


Figura 4. Porcentaje de las intoxicaciones debidas a diferentes tipos de tóxicos en animales silvestres y domésticos analizados de diferentes Comunidades Autónomas de España entre 2004 y 2010.

Discusión

El porcentaje de casos positivos detectados (41,2%) ha sido similar a los descritos en otros países como Austria (46,1%, investigando intoxicaciones por plaguicidas) [46], República Checa (49,2%, investigando intoxicaciones por carbofurano) [47]. Las diferencias observadas entre CCAA en la positividad de los análisis pueden ser debidas a diferencias en el criterio de envío de muestras por parte de los veterinarios de los centros de recuperación o la estrategia marcada por los técnicos de cada región. En algunas CCAA, como Aragón o Castilla-La Mancha, se opta por el envío de los casos con indicios de intoxicación y todos los correspondientes a especies amenazadas como quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) o águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*). Además, a criterio del veterinario, animales que pueden haber muerto por electrocución o traumatismo también son enviados para descartar la implicación adicional de un tóxico en el accidente [17,48-51]. Estos factores pueden aumentar los resultados negativos en dichas CCAA en comparación con otras que únicamente remiten los casos más claros de envenenamientos [28,43].

El grupo de animales más afectado por las intoxicaciones ha sido el de las aves rapaces (Tabla 2), siguiendo así con la tendencia de años anteriores en España [26,52] y otros países europeos [14,26,28,47,53]. Los mamíferos carnívoros fueron el segundo grupo más afectado por los envenenamientos en la mayoría de las zonas estudiadas, y en el caso de Asturias y Cantabria llegaron a ser los más frecuentemente intoxicados. La Cordillera Cantábrica, al tener una importante cabaña ganadera en régimen extensivo y haber una presencia estable de lobo (*Canis lupus*), es una zona de riesgo de uso de veneno por parte de los ganaderos con el fin de proteger a sus reses de los ataques de este cánido [18,38,40,52]. Esta práctica de control de depredadores fue apoyada por el gobierno Español hasta el año 1975 y ha quedado arraigada en ciertos sectores de la población a pesar de estar prohibida desde 1989 y tipificada como delito en el código penal [25].

La intencionalidad del envenenamiento ha sido considerada en el 78,3% de los animales intoxicados. Este factor se vio negativamente afectado por la aparición de una plaga de topillo campesino en 2007 en Castilla y León que fue tratada de forma extensiva con rodenticidas anticoagulantes en grano distribuido en superficie con abonadora [35,36,43,54], lo que hizo que en ese año (Figuras 1 y 2) y en esa Comunidad Autónoma (Tabla 1) aumentasen los casos de intoxicaciones accidentales. Aunque los rodenticidas anticoagulantes han sido detectados en algunos casos en cebos preparados intencionadamente para matar depredadores [43], lo normal es que los carnívoros silvestres, las rapaces diurnas y, especialmente, las rapaces nocturnas (Tabla 2) resulten intoxicados de forma accidental a consecuencia de la exposición secundaria a cumarinas de segunda generación debido a la larga vida media de dichos compuestos en los tejidos de depredadores y presas [8,43,55]. Una descripción más detallada de los rodenticidas anticoagulantes detectados y sus concentraciones presentes en la presente muestra puede ser consultada en Sánchez-Barbudo y col. [43].

En las CCAA en las que el IREC actúa como laboratorio de referencia para los envenenamientos de fauna silvestre la intencionalidad de los casos ha sido elevada (79,2-100%) y asociada al uso de venenos de rápida acción neurotóxica (insecticidas anticolinesterásicos, estricnina, organoclorados o α -cloralosa). Los carbamatos han producido frecuentemente intoxicaciones, tanto intencionadas como accidentales en fauna silvestre y doméstica [23,37,39,40,46,47]. En el caso de los anticolinesterásicos (organofosforados y carbamatos)

hemos observado que de los 483 animales intoxicados por dichos compuestos, solo 10 (2,1%) resultaron expuestos accidentalmente. Este dato contrasta con otros estudios llevados a cabo en aves rapaces en Canadá y Estados Unidos, que observan un mayor grado de intoxicaciones accidentales (34,9% y 24,7% respectivamente), y se parece más al valor observado en Reino Unido (4,9%) [13]. La intoxicación accidental por insecticidas anticolinesterásicos puede ser debida a la ingestión de formulados en forma de granulado que las aves granívoras pueden confundir con gastrolitos (“grit”) o semillas [13,33,50,56], por el consumo de semillas blindadas con estos insecticidas [29,51] o bien debido a intoxicaciones secundarias en depredadores por el consumo de presas intoxicadas por las razones descritas anteriormente [13,27].

La existencia de diferencias en los compuestos detectados en las intoxicaciones entre las diferentes CCAA estudiadas debe ser tenida en cuenta a la hora de gestionar y luchar contra las intoxicaciones intencionadas y accidentales en los diferentes territorios españoles. Así, por ejemplo, la mayor aparición de estricnina en los animales y cebos de Asturias que en otras CCAA debería motivar una mayor investigación policial sobre la distribución y uso de este alcaloide. La estricnina ha sido ampliamente utilizada en España con el fin de envenenar animales [15,25,41,57], pero es en Asturias donde actualmente persiste como veneno mayoritario asociado al control ilegal de depredadores como el lobo. Por otra parte, los carbamatos en la zona centro (Madrid y Castilla-La Mancha) se mantienen como los principales compuestos usados ilegalmente para matar pequeños y medianos depredadores en cotos de caza [58,59]. Este escenario contrasta con la situación observada en Aragón, en que predominan las intoxicaciones de depredadores por organofosforados asociadas a la caza y la ganadería (p.e. envenenamientos masivos de buitres). Esta diferencia puede ser debida a la disponibilidad de productos en determinadas zonas, como puede ser el Valle del Ebro, que con una mayor superficie de agricultura de regadío podría tener más accesibles diferentes tipos de organofosforados en comparación con la especialización en el uso de carbofurano y aldicarb en los cotos de caza menor de Castilla-La Mancha y Madrid. Por último, en Cataluña se observan algunos tóxicos poco o nada detectados en otras CCAA, como son la α -cloralosa y los barbitúricos. La α -cloralosa se ha usado junto con secobarbital en Cataluña para controlar la expansión de colonias de gaviota patiamarilla (*Larus cachimans*) [60]. Las intoxicaciones por barbitúricos en aves carroñeras se pueden dar por el consumo de animales eutanasiados [61], sin embargo los casos detectados en Cataluña han sido envenenamientos intencionados, e incluso han sido detectados cebos preparados con dichos fármacos. Una descripción más detallada de los compuestos detectados dentro de cada uno de estos grupos de tóxicos, sus concentraciones y los efectos sobre biomarcadores será publicada en próximos trabajos.

La mayoría de los cebos analizados estaban preparados con carne, sus derivados o despojos animales. El uso de carne cruda o directamente de cadáveres de animales para preparar cebos envenenados se ha utilizado ampliamente en todo el mundo [23,24,37,39,40]. En la preparación de dichos cebos se han empleado principalmente productos como plaguicidas y biocidas que, en el momento de su uso ilícito como veneno, ya estaban prohibidos para otras aplicaciones legales [25]. Esto indica que determinados productos comerciales con una alta riqueza de principio activo de baja DL₅₀ habrían sido seleccionados dado que se necesitaría poca cantidad de producto para ser letal sin llegar a alterar las características organolépticas del cebo. Otro riesgo que conllevan estos productos comerciales con alta riqueza de principio activo de baja DL₅₀ es que su almacenamiento

con fines ilegales después de su retirada como plaguicidas o biocidas podría verse facilitado por el poco espacio que ocupan cantidades que permitirían seguir preparando cebos durante años. En futuras regulaciones de plaguicidas y biocidas se debería tener en cuenta el riesgo para la biodiversidad del uso ilegal en la preparación de cebos envenenados que comporta la comercialización de formulados con alta riqueza de ingredientes activos con baja DL₅₀ [25,62]. La toxicovigilancia, tanto para el seguimiento de las intoxicaciones accidentales como de las intencionadas en el medio natural, debe ser mantenida o extendida a todas las CCAA españolas, sin dejar de prestar atención a los casos detectados en animales domésticos, que como en este estudio se observa reportan un mayor porcentaje de éxito en la detección de los tóxicos y por lo tanto pueden ser buenos centinelas del uso ilegal de venenos [63].

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado mediante los contratos establecidos entre el IREC y las CCAA de Aragón, Castilla-La Mancha, Cataluña, Madrid, Asturias, Cantabria, Navarra y País Vasco para llevar a cabo análisis toxicológicos de fauna salvaje. Queremos agradecer a todo el personal implicado en la lucha contra el veneno en el medio natural en cada una de estas CCAA su colaboración para poder llevar a cabo este estudio. Las muestras de Castilla y León, Extremadura y Andalucía han sido enviadas al IREC por el SEPRONA, organizaciones conservacionistas no gubernamentales y diferentes asociaciones de cazadores a las que también queremos agradecerles su colaboración.

Bibliografía

1. Álvarez-Uría P, Zamorano C (2007) La biodiversidad en España. *Ambienta* 65:74-76.
2. Margalida A, Heredia R, Razin M, Hernández M (2008) Sources of variation in mortality of the Bearded Vulture *Gypaetus barbatus* in Europe. *Bird Conserv Int* 18:1-10.
3. Paquet PC, Darimont CT (2010) Wildlife conservation and animal welfare: Two sides of the same coin? *Anim Welf* 19:177-190.
4. Cramp S (1973) Wildlife review. The effects of pesticides on British wildlife. *Br Vet J* 129:315-323.
5. Stanley PI, Bunyan PJ (1979) Hazards to wintering geese and other wildlife from the use of dieldrin, chlorfenvinphos and carbophenothion as wheat seed treatments. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205:31-45.
6. White DH, Hayes LE, Bush PB (1989) Case histories of wild birds killed intentionally with famphur in Georgia and West Virginia. *J Wildl Dis* 25:184-188.
7. Jenni-Eiermann S, Bühler U, Zbinden N (1996) Vergiftungen von Greifvögeln durch Carbofuran im Ackerbau. *Ornithol Beob* 93:69-77.
8. Berny PJ, Buronfosse T, Buronfosse F, Lamarque F, Lorgue G (1997) Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere* 35:1817-1829.
9. Antoniou V, Zantopoulos N, Tsoukali H (1997) Fatal animal poisonings in northern Greece: 1990-1995. *Vet Hum Toxicol* 39:35-36.

10. Burgat V, Keck G, Guerre P, Bigorre V, Pineau X (1998) Glyphosate toxicosis in domestic animals: a survey from the data of the Centre National d'Informations Toxicologiques Vétérinaires (CNITV). *Vet Hum Toxicol* 40:363-367.
11. Navas I, Motas-Guzmán M, María-Mojica P, Romero D, García-Fernández AJ (1998) Intoxicaciones accidentales e intencionadas en perros y gatos en el Sudeste de España (1994–1996). *Rev Toxicol* 15:110-113.
12. María-Mojica P, Romero D, Motas-Guzmán M, Navas I, García-Fernández AJ (1998) Estudio retrospectivo de casos de envenenamientos de animales de compañía y aves en el sudeste de España. *Rev Toxicol* 15:105-109.
13. Mineau P, Fletcher MR, Glaser LC, Thomas NJ, Brassard C, Wilson LK, Elliott JE, Lyon LA, Henny CJ, Bollinger T, Porter SL (1999). Poisoning of raptors with organophosphorus and carbamate pesticides with emphasis on Canada, US and UK. *J Raptor Res* 33:1-37.
14. de Snoo GR, Scheidegger NMI, De Jong FMW (1999) Vertebrate wildlife incidents with pesticides: A European survey. *Pestic Sci* 55:47-54.
15. Guitart R, Mañosa S, Guerrero X, Mateo R (1999) Animal poisonings: the 10-year experience of a veterinary analytical toxicology laboratory. *Vet Hum Toxicol* 41:331-335.
16. Shore RF, Birks JDS, Afsar A, Wienburg CL, Kitchener AC (2003) Spatial and temporal analysis of second-generation anticoagulant rodenticide residues in polecats (*Mustela putorius*) from throughout their range in Britain, 1992-1999. *Environ Pollut* 122:183-193.
17. Stone WB, Okiniewski JC, Stedelin JR (2003) Anticoagulant rodenticides and raptors: Recent findings from New York, 1998-2001. *Bull Environ Contam Toxicol* 70:34-40.
18. Whitfield DP, McLeod DRA, Watson J, Fielding AH, Haworth PF (2003) The association of grouse moor in Scotland with the illegal use of poisons to control predators. *Biol Conserv* 114:157-163.
19. Forrester MB, Stanley SK (2004) Patterns of animal poisonings reported to the Texas Poison Center Network: 1998–2002. *Vet Hum Toxicol* 46:96-99.
20. Fleischli MA, Franson JC, Thomas NJ, Finley DL, Riley WJR (2004) Avian mortality events in the United States caused by anticholinesterase pesticides: a retrospective summary of National Wildlife Health Center records from 1980 to 2000. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:542-550.
21. Kwon YK, Wee SH, Kim JH (2004) Pesticide poisoning events in wild birds in Korea from 1998 to 2002. *J Wildl Dis* 40:737-740.
22. Pérez-López M, Nóvoa-Valiñas MC, García-Fernández MA, Melgar-Riol MJ. 2004. Two years' activity of the Veterinary Toxicology Attention Service of Lugo, Spain. *Vet Hum Toxicol* 46:47-49.
23. Wobeser G, Bollinger T, Leighton FA, Blakley B, Mineau P (2004) Secondary poisoning of eagles following intentional poisoning of coyotes with anticholinesterase pesticides in Western Canada. *J Wildl Dis* 40:163-172.
24. García-Fernández AJ, María-Mojica P, Martínez-López E, Romero D, Navas I, Hernández-García A, Gómez-Ramírez P (2006) Aspectos clínicos y forenses del envenenamiento de aves silvestres: Diferencias entre aldicarb y estricnina. *Rev Toxicol* 23:44-48.
25. Martínez-Haro M, Mateo R, Guitart R, Soler-Rodríguez F, Pérez-López M, María-Mojica P, García-Fernández AJ (2008) Relationship of the toxicity of pesticide formulations and their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. *Ecotoxicol Environ Saf* 69:396-402.
26. Guitart R, Sachana M, Caloni F, Croubels S, Vandenbroucke V, Berny P (2010) Animal poisoning in Europe. Part 3: Wildlife. *Vet J* 183:260-265.
27. Martínez-Haro M, Mateo M, Cardiel I, Reglero MM, Guitart R (2006) Intoxicaciones por plaguicidas anticolinesterásicos en fauna cinegética y sus depredadores silvestres. *Rev Toxicol* 23:39-43.
28. Berny PJ (2007) Pesticides and the intoxication of wild animals. *J Vet Pharmacol Therap* 30:93–100.
29. Pain DJ, Gargi R, Cunningham AA, Jones A, Prakash V (2004) Mortality of globally threatened sarus cranes (*Grus antigone*) from monocrotophos poisoning in India. *Sci Total Environ* 326:55-61.
30. Rendon-Von J, Soares AMVM, y Guilhermino L (2005) Black-bellied whistling duck (*Dendrocygna autumnales*) brain cholinesterase characterization and diagnosis of anticholinesterase pesticide exposure in wild populations from México. *Environ Toxicol Chem* 24(2):313-317.
31. Cobos VM, Mora MA, Escalona G (2006) Inhibición de colinesterasa plasmática en zorzal pardo (*Turdus grayi*), expuesto a diazinón en cultivos de papaya maradol en Yucatán, Méjico. *Rev Toxicol* 23:17-21.
32. Martínez-Haro M, Viñuela J, Mateo R (2007) Exposure of birds to cholinesterase-inhibiting pesticides following a forest application for tick control. *Environ Toxicol Pharmacol* 23:347-349.
33. Elliott JE, Birmingham AL, Wilson LK, McAdie M, Trudeau S, Mineau P (2008) Fonofos poisons raptors and waterfowl several months after granular application. *Environ Toxicol Chem* 27:452-460.
34. Guitart R, Mateo R, Gutierrez JM, To-Figueras J (1996) An outbreak of thiram poisoning on Spanish poultry farms. *Vet Hum Toxicol* 38:287-288.
35. Sarabia J, Sánchez-Barbudo I, Siqueira W, Mateo R, Rollán E, Pizarro M (2008) Lesions associated with the plexus venosus subcutaneus collaris of pigeons with chlorophacinone toxicosis. *Avian Dis* 52:540-543.
36. Oleaga PP, Sánchez-Barbudo IS, Viñuela J, Barja I, Mateo-Tomás P, Piñeiro A, Mateo R, Purroy FJ (2009) Lack of scientific evidence and precautionary principle in massive release of rodenticides threatens biodiversity: Old lessons need new reflections. *Environ Conserv* 36:1-4.
37. Allen GT, Veatch JK, Stroud RK, Vendel CG, Poppenga RH, Thompson L, Shafer JA, Braselton WE (1996) Winter poisoning of coyotes and raptors with Furadan-laced carcass baits. *J Wildl Dis* 32:385-389.
38. Glen AS, Gentle MN, Dickman CR (2007). Non-target impacts of poison baiting for predator control in Australia. *Mammal Rev* 37:191-205.

39. Venkataramanan R, Sreekumar C, Kalaivanan N (2008) Malicious Carbofuran poisoning of a Leopard (*Panthera pardus*) in Sandynallah reserve forest, India. *J Wildl Rehab* 29:15-17.
40. Otieno PO, Lalah JO, Virani M, Jondiko IO, Schramm KW (2010) Carbofuran and its toxic metabolites provide forensic evidence for Furadan exposure in vultures (*Gyps africanus*) in Kenya. *Bull Environ Contam Toxicol* 84:536-544.
41. Motas-Guzmán M, María-Mojica P, Romero D, Martínez-López E, García-Fernández AJ (2003) Intentional poisoning of animals in Southeastern Spain: A review of the veterinary toxicology service from Murcia, Spain. *Vet Hum Toxicol* 45:47-50.
42. Brown P, Charlton A, Cuthbert M, Barnett L, Ross L, Green M, Gillies L, Shaw K, Fletcher M (1996) Identification of pesticide poisoning in wildlife. *J Chromatogr A* 754:463-478.
43. Sánchez-Barbudo IS, Camarero PR, Mateo R (2012) Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. *Sci Total Environ* 420:280-288.
44. Reglero MM, Monsalve-González L, Taggart MA, Mateo R (2008) Transfer of metals to plants and red deer in an old lead mining area in Spain. *Sci Total Environ* 406:287-297.
45. Zhong WZ, Lemley AT, Spalik J (1984) Quantitative determination of ppb levels of carbamate pesticides in water by capillary gas chromatography. *J Chromatogr* 299:269-274.
46. Wang Y, Kruzik P, Helsing A, Helsing I, Rausch WD (2007) Pesticide poisoning in domestic animals and livestock in Austria: A 6 years retrospective study. *Forensic Sci Int* 169:157-160.
47. Novotný L, Misík J, Honzlová A, Ondráček P, Kuča K, Vávra O, Rachač V, Chloupek P (2011) Incidental poisoning of animals by carbamates in the Czech Republic. *J Appl Biomed* 9:157-161.
48. Ferrer A (2003) Intoxicación por plaguicidas. *Anales Sis San Navarra* 26 (supl.1):155-171.
49. Costa LG (2006) Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366:1-13.
50. Cáceres T, Megharaj M, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R (2010) Fenamiphos and related organophosphorus pesticides: Environmental fate and toxicology. *Rev Environ Contam Toxicol* 205:117-162.
51. Mitra A, Chatterjee C, Mandal FB (2011) Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Res J Environ Toxicol* 5:81-96.
52. Mateo-Tomás P, Olea PP, Sánchez-Barbudo IS, Mateo R (2012) Alleviating human-wildlife conflicts: Identifying the causes and mapping the risk of illegal poisoning of wild fauna. *J Appl Ecol* 49:376-385.
53. Vandenbroucke V, Van Pelt H, De Backer P, Croubels S (2010) Animal poisonings in Belgium: A review of the past decade. *Vlaams Diergen Tijds* 79:259-268.
54. Vidal D, Alzaga V, Luque-Larena JJ, Mateo R, Arroyo L, Viñuela J (1999) Possible interaction between a rodenticide treatment and a pathogen in common vole (*Microtus arvalis*) during a population peak. *Sci Total Environ* 408:267-271.
55. Eason CT, Murphy EC, Wright GRG, Spurr EB (2002) Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicology* 11:35-48.
56. Augspurger T, Smith MR, Meteyer CU, Converse KA (1996) Mortality of passerines adjacent to a North Carolina corn field treated with granular carbofuran. *J Wildl Dis* 32:113-116.
57. Martínez-López E, Romero D, María-Mojica P, Navas I, Gerique C, Jiménez P, García-Fernández AJ (2006) Detection of strychnine by gas chromatography-mass spectrometry in the carcass of a Bonelli's eagle (*Hieraetus fasciatus*). *Vet Rec* 159:182-183.
58. Hernández M, Margalida A (2008) Pesticide abuse in Europe: Effects on the Cinereous vulture (*Aegypius monachus*) population in Spain. *Ecotoxicology* 17:264-272.
59. Hernández M, Margalida A (2009) Poison-related mortality effects in the endangered Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) population in Spain. *Eur J Wildl Res* 55:415-423.
60. Bosch M, Oro D, Cantos FJ, Zabala M (2000) Short-term effects of culling on the ecology and population dynamics of the yellow-legged gull. *J Appl Ecol* 37:369-385.
61. O'Rourke K (2002) Euthanatized animals can poison wildlife: veterinarians receive fines. *J Am Vet Med Assoc* 220:146-147.
62. Mateo R (2011) Toxicology and wildlife conservation in Europe: The inadequacy of current EU regulations. *Vet J* 183:241-242.
63. Mateo R, Guitart R (2000). Los animales domésticos como centinelas del uso del veneno en España. En: Sánchez JJ, Roig M. (eds). Congreso Internacional sobre el Uso del Veneno en el Medio Natural. Resumen de Ponencias - Resoluciones. Mallorca, Black Vulture Conservation Foundation (BVCF). pp. 56.

Análisis de la casuística del Servicio de Atención Toxicológica Veterinaria (SATVe) en el período 2001-2007.

Novoa MC¹, Melgar MJ^{1*}, García MA¹, Alonso J¹ y Pérez-López M²

Área de Toxicología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela¹ (Campus de Lugo), 27002- LUGO y Universidad de Extremadura², 10071-CÁCERES.

Recibido 4 de mayo de 2012 / Aceptado 3 de junio de 2012

Resumen: El Servicio de Atención Toxicológica Veterinaria (SATVe), localizado en la Facultad de Veterinaria de Lugo (USC), tiene por función resolver problemas relacionados con la toxicología clínica veterinaria remitidos por los profesionales a través de consultas mediante técnicas telemáticas y analíticas. En el presente trabajo se analiza la casuística toxicológica del servicio durante el período 2001-2007 en relación con diversos aspectos: origen geográfico de la demanda, tipo de solicitud efectuada, usuarios solicitantes, especies animales afectadas y tóxicos implicados. Respecto a la casuística, aumentó considerablemente los primeros años, observándose posteriormente una tendencia al mantenimiento de unos 100 casos anuales, siendo esta mayoritariamente procedente de Galicia (92,2%), según orden decreciente: Lugo > Pontevedra > A Coruña > Ourense. La mayoría de las consultas se originaron por profesionales veterinarios (71,6%) frente a la Administración (13,2%) y los particulares (12,3%). Los casos que más se remitieron, procedían de la especie canina (48,7%) seguido de la equina (12,3%), ocupando los félidos la tercera posición (8,4%). Respecto a las analíticas, los tóxicos mayoritariamente detectados (48%) fueron estrocnina, metiocarb y fenobarbital.

Palabras clave: Toxicología clínica, origen geográfico, usuario, especie animal, tóxicos.

Abstract: Analysis of the casuistry of the Service of Veterinary Toxicology (SATVe) in the period 2001-2007. The function of the Veterinary Toxicology Attention Service (SATVe), located at the Veterinary School of Lugo (USC), is to solve questions of veterinary clinical and analytical toxicology submitted by health professionals through telematics consultations and to provides analytical techniques. This work analyzes the toxicological casuistry of the period 2001-2007 on different aspects: geographical origin of consultations, type of request, requesting users, animal species affected and toxic compounds involved. Regarding the casuistry, significantly increased the first years, later observed an evolution to the maintenance of about 100 cases a year, this being mainly from Galicia (92.2%), according to the decreasing order: Lugo > Pontevedra > A Coruña > Ourense. Most queries were originated from veterinary practitioners (71.6%) compared to government agencies (13.2%) and private users (12.3%). Most of the cases referred, came from canines (48.7%), followed by equines (12.3%), occupying the third place felines (8.4%). Regarding toxicological analysis, the main toxic compounds detected (48%) were strychnine, methiocarb and phenobarbital.

Keywords: clinical toxicology, geographical origin, user, animal species, toxic compounds.

Introducción

La Toxicología Veterinaria se centra en evaluar y paliar los efectos negativos provocados por los compuestos químicos más variados sobre las distintas especies animales (no sólo domésticas, sino incluso la fauna salvaje) que poseen un marcado interés para el ser humano, ya sea afectivo o económico. Si a este hecho se añade la posibilidad de realizar un seguimiento sobre el estado global del medio ambiente (con su repercusión directa sobre el ser humano), resulta evidente la importancia que esta rama de la Toxicología posee dentro del contexto general de las Ciencias Veterinarias. Así, la Toxicología Clínica ha ido adquiriendo relevancia e imponiéndose en el aprendizaje de la práctica Veterinaria cotidiana. Sin embargo, las intoxicaciones representan sólo una parte de la actividad del clínico veterinario, por lo que a este profesional le resulta muy difícil estar al tanto de los nuevos conocimientos y avances científicos en este campo. Además, cuando existe una sospecha de intoxicación, la confirmación diagnóstica necesita un abordaje múltiple, considerando al animal no solo desde el punto de vista individual, sino también como posible parte de un conjunto (ganado de renta, criaderos, etc.) y, en todo caso, inmerso en un medio con el que interactúa [1].

Por ello, uno de los principales objetivos del Toxicólogo Veterinario es establecer una relación directa y constante con los profesionales clínicos, que le permita retroalimentarse de sus observaciones, lo que hace de la Toxicología una ciencia viva que se enriquece de casos reales. En este sentido, cobra gran importancia el desarrollo de los "centros antiveneno" o "centros antitóxico", que ha permitido responder regularmente a las demandas de los profesionales clínicos, los ganaderos o dueños de mascotas, y los distintos estamentos públicos con implicación en las intoxicaciones animales.

El Servicio de Atención Toxicológica Veterinaria, de la Facultad de Veterinaria de Lugo (Universidad de Santiago de Compostela)-Fundación Hospital Clínico Veterinario Rof Codina, nace en 2001 con el objetivo de ofrecer al público en general soluciones en el campo de la toxicología veterinaria, entre las que se incluye: facilitar información acerca de los compuestos químicos y sus dosis tóxicas (según las especies de interés en la práctica veterinaria), los riesgos derivados de su abuso (accidental o no), los diversos antídotos y tratamientos (específicos o sintomáticos) que puedan instaurarse, etc., y actuar como laboratorio cuyas determinaciones analíticas, permita la confirmación de aquellos cuadros clínicos en los que exista sospecha del xenobiótico causante de la etiología.

El objetivo de este trabajo es evaluar la información toxicológica completa (consultas y analíticas toxicológicas) recabada a través del SATVe durante el período 2001-2007 sobre las principales intoxicaciones animales, atendiendo a diferentes criterios que ayuden

*e-mail: mj.melgar/usc.es

a la interpretación de la casuística.

Material y métodos

El adecuado funcionamiento del SATVe, se asienta en dos grandes modalidades de trabajo y por ello el estudio de los resultados obtenidos en el periodo 2001-2007 se ha efectuado atendiendo a esa estructura; por un lado la sección de apoyo informativo toxicológico con metodología clínica, y por otra parte, la sección con metodología de analítica química.

En este trabajo se plantea el análisis detallado y la evolución de la casuística toxicológica referida al Servicio, atendiendo a diversos criterios de interpretación:

- tipo de demanda (consulta informativa – análisis químico),
- evolución temporal del número de casos,
- origen y distribución geográfica,
- principales demandantes del servicio,
- especies animales más afectadas y
- principales tóxicos detectados.

Respecto al procedimiento analítico, los materiales biológicos que con más frecuencia se reciben en el laboratorio cuando existe sospecha de intoxicación, dependiendo de si el animal está vivo o muerto, son: orina, sangre o suero, vómito, contenido o lavado gástrico/ruminal, pelo/lana, faneras, saliva, cebos o alimentos sospechosos, vísceras, etc. En general, se remiten dichas muestras de acuerdo con un seguimiento adecuado, y proporcionando la mayor cantidad posible con el fin de, al menos, poder orientar la investigación hacia alguna de las grandes familias de tóxicos existentes [1]. Los métodos analíticos aplicados en el SATVe dependen de la naturaleza del tóxico; así los tóxicos más volátiles (alcoholes, hidrocarburos aromáticos o monóxido de carbono) requieren procedimientos analíticos especiales, distintos de los necesarios para identificar compuestos químicos orgánicos (plaguicidas, micotoxinas, medicamentos, etc.), o tóxicos inorgánicos (metales, aniones). En este sentido, se pueden diferenciar varias etapas que se realizan en el SATVe, tales como pretratamiento de las muestras, extracción/purificación y técnicas de cribado o aproximación, para finalizar con técnicas analíticas confirmatorias. Entre las técnicas confirmatorias más utilizadas están:

- Espectrometría de masas (MS, técnica de identificación) y las técnicas instrumentales de separación acopladas a ella, como cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC o LC), para identificar compuestos orgánicos.
- Espectrometría de emisión atómica con acoplamiento a la espectrometría de masas (ICP-MS), espectrometría atómica con acoplamiento de plasma inducido (ICP-OES) o voltamperometría para compuestos inorgánicos (metales).
- Espectrofotometría VIS/UV para identificar diversos compuestos tanto orgánicos (herbicidas) como inorgánicos (nitratos), o para efectuar valoraciones indirectas de compuestos orgánicos por inducción o inhibición enzimática, etc.

Resultados y discusión

Teniendo en cuenta los diversos aspectos de este estudio, anteriormente mencionados, se muestran los resultados obtenidos.

1. Distribución de los casos según el tipo de demanda: consultas y analíticas.

Con respecto a la solicitud del servicio, en general, el número de consultas fue superior al de demanda de análisis. Sin embargo, teniendo en cuenta que en una consulta se suele solicitar una única información (por ejemplo, vida media de un compuesto, tratamiento de una determinada intoxicación, etc.), la resolución de un caso que conlleve una analítica, implica el estudio de una media de 3 muestras diferentes, y por tanto el cómputo final de las analíticas tiene un peso real mucho mayor que las consultas, dentro de la labor efectuada en el SATVe (Figura 1).

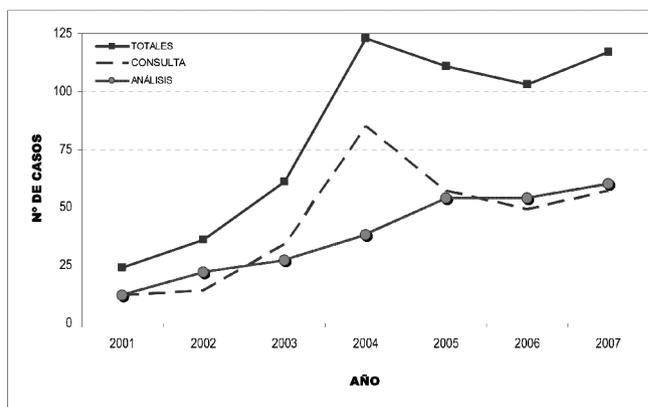


Figura 1. Evolución anual del número total de casos, consultas recibidas y análisis toxicológicos realizados en el SATVe, en el periodo 2001-2007.

2. Evolución anual del número total de casos:

Consultas y analíticas.

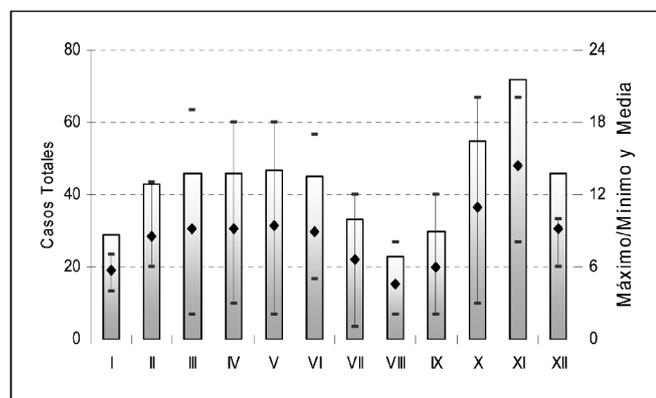
Desde su creación en el año 2001, el SATVe ha registrado un total de más de 500 casos, incrementándose notablemente su actividad, sobre todo en la sociedad gallega. De hecho, la evolución anual global del número de casos recibidos muestra un aumento aproximado del 70%, incrementándose de 36 a 117 casos. Este aumento se observa, sobre todo, en los primeros años de funcionamiento; así, en 2004 se duplicó el número de casos con respecto al año anterior. Posteriormente, tiende a mantenerse en torno a una cifra total de 100 casos por año (Figura 1), siendo superior a la tendencia reflejada por otros Servicios de Toxicología Veterinaria similares [2].

En la evolución del número de consultas y de analíticas (Figura 1), se puede apreciar un pico asociado al año 2004, correspondiente a consultas. Esta evolución puede explicarse por las labores de promoción del Servicio, que se realizaron exclusiva e intensamente en los dos primeros años de su funcionamiento (2001 y 2002). Durante este periodo, a medida que se iba teniendo conocimiento de la existencia del Servicio, de forma directa, crecía el número de casos registrados y, posteriormente mediante el procedimiento del “boca a boca”, esta tendencia se mantuvo hasta el pico alcanzado en 2004. Posteriormente, se consolidó un número más o menos constante de usuarios que conocían y utilizaban el Servicio, y así se incrementó de 12 consultas en 2001 a 57 en 2007.

Con respecto a la evolución anual de las solicitudes de análisis (Figura 1), existe una clara tendencia ascendente, prácticamente lineal, con un incremento del 80% (12 casos en 2001, 60 en 2007) desde el inicio del funcionamiento del SATVe.

Distribución estacional/mensual.

En general, se produce un descenso del número de casos en verano, contrastando con el pico que aparece en primavera (Figura 2) que podría relacionarse con los tratamientos fitosanitarios más frecuentes. Así mismo, la frecuencia máxima observada en invierno en las consultas de la especie canina, podría atribuirse a los tratamientos rodenticidas aplicados en los edificios.



I: Enero; II: Febrero; III: Marzo; IV: Abril; V: Mayo; VI: Junio; VII: Julio; VIII: Agosto; IX: Septiembre; X: Octubre; XI: Noviembre; XII: Diciembre.

Figura 2. Distribución mensual acumulada de los casos toxicológicos remitidos al SATVe, en el periodo 2003-2007. Las barras representan el número de casos totales acumulados en el mes indicado, entre los años 2003 y 2007.

Esta distribución temporal del número de casos es similar a la mostrada por el Servicio homólogo de la Universidad de Murcia, en donde, para el período 1992-2002, el menor número de casos también se produjo en verano (6%), y la mayor frecuencia se registró en invierno (40%), seguido de primavera (32%) y otoño (22%) [3,4].

3. Origen y distribución geográfica.

La implantación del SATVe ha sido relevante para el conjunto de la sociedad gallega, pues esta originó el 92,2% del total de casos (Figura 3). Pero también se han registrado casos procedentes de diversos puntos de la península (7,1% del total de casos), destacando por su relevancia numérica, los procedentes de Alicante, Valencia, Asturias y Madrid, e incluso se han recibido consultas desde más allá de nuestras fronteras de Cuba, Portugal y Uruguay (0,7%).

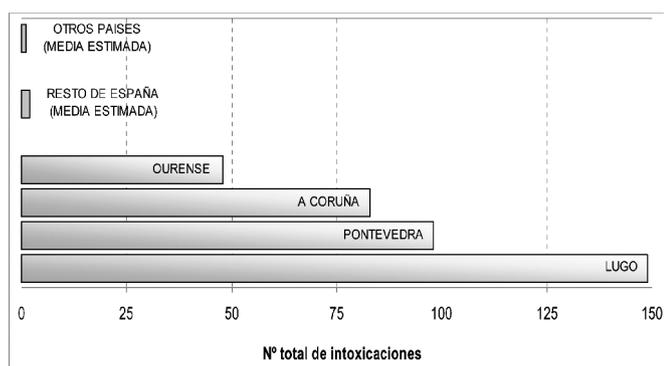


Figura 3. Número total de intoxicaciones remitidas al SATVe, en el periodo 2001-2007, según la procedencia geográfica.

En el ámbito territorial de la Comunidad Autónoma de Galicia, Lugo

es la provincia desde donde más casos fueron remitidos, un 39,4%, seguida por Pontevedra y A Coruña, con un 25,9 y un 22,0%, respectivamente, y, finalmente, Ourense, con alrededor del 13%. El mayor número de casos remitidos desde Lugo sobre el conjunto gallego, podría atribuirse a la coincidencia geográfica de la Facultad de Veterinaria de la USC.

Esta distribución era la esperada, dado que las labores de promoción y difusión del Servicio se circunscribieron exclusivamente a Galicia. Posteriormente, la existencia del Servicio se iría conociendo en las zonas limítrofes de nuestra Comunidad Autónoma, repercutiendo en la recepción de algunos casos, y ampliándose, a partir de 2003, el conocimiento de dicho Servicio al resto del territorio nacional, así como a Portugal e Iberoamérica.

El reparto de los casos procedentes de la zona rural y urbana depende de la especie, así, se puede observar que los cánidos presentan una distribución más homogénea entre ambas zonas, mientras que el número de casos referidos al gato se originan mayoritariamente en las zonas urbanas. Esto podría explicarse porque el perro es un animal de compañía en los dos ámbitos, mientras que el gato (a pesar de ser muy habitual en el medio rural) es considerado como animal de compañía casi exclusivamente en las ciudades. Lejos de relacionarse con el número de animales existentes de cada especie, el mayor número de intoxicaciones en perro se originaría tanto por la elevada exposición a plaguicidas, ligado al lugar donde viven (proximidad a cultivos tratados y lugares de almacenamiento de estos productos), como al carácter de esta especie animal más dependiente del hombre, facilitando que se detecte al animal enfermo [5]. Los casos remitidos por intoxicación de gatos en zona rural son minoritarios debido a diversos factores, tanto porque no suelen ingerir los materiales que se encuentran (sobradamente es conocido su carácter más esquivo y desconfiado), evitando las intoxicaciones, como por su modo de vida vagabunda en estas zonas y su tendencia a esconderse en cuanto se encuentran enfermos, impidiendo su localización y, por lo tanto, se remiten menos casos de intoxicación en ellos [5]. En consecuencia, el gato parece, pues, menos atendido en la zona rural que el perro. Para el resto de las especies, prácticamente todos los casos de intoxicación tienen origen en la zona rural.

4. Principales demandantes del Servicio.

Los profesionales clínicos veterinarios (PCV) son los principales usuarios del Servicio de Atención Toxicológica Veterinaria (SATVe), con un total de 324 casos, lo que representa un 71,6% de los 452 casos totales (Tabla 1). Dentro de este grupo, se diferencia mayoritariamente los profesionales clínicos de ejercicio libre (CL) con 283 casos (85%) del total de demandas de los PCV (61% del total de casos), y aquellos que prestan sus servicios en el Hospital Clínico Veterinario-Fundación Rof Codina (HCV-FRC, nombrados como FRC), que generan un número inferior de casos (41 casos, 12,6% del total de PCV, 9% del total de demandantes).

Las distintas administraciones (A) y los particulares (P) ocupan el segundo y tercer lugar en número de casos remitidos 60 y 56 casos, respectivamente, con un porcentaje bastante similar (13,2 y 12,3%). Hay que tener en cuenta que el particular se asocia inevitablemente al PCV, en la mayoría de las ocasiones, puesto que, si el animal muere, es el profesional el que realiza las actuaciones en el cadáver y quien remite las muestras al laboratorio. En las intervenciones sin mortalidad, particular y PCV también suelen estar asociados, porque el veterinario concreta los síntomas y emite las hipótesis generales de partida para el diagnóstico. En ambas situaciones se registra el profesional clínico de contacto como demandante del Servicio.

Tabla 1. Identificación de los principales demandantes de información y demandantes de análisis en intoxicaciones remitidas al SATVe, en el periodo de 2003 a 2007.

INFORMACIÓN			ANÁLISIS		
DEMANDANTE	Total	Porcentaje	DEMANDANTE	Total	Porcentaje
FRC	18	8,3	FRC	23	9,8
CL	161	74,5	CL	122	51,7
TOTAL PCV	179	82,9	TOTAL PCV	145	61,4
J	0	0,00	J	3	1,3
MA/S	0	0,00	MA/S	49	20,8
MR	0	0,00	MR	3	1,3
Pe	1	0,46	Pe	4	1,7
TOTAL A	1	0,5	TOTAL A	59	25,0
TOTAL P	36	16,7	TOTAL P	20	8,5
AD	0	0,00	AD	3	1,3
Coo	0	0,00	Coo	4	1,7
Fac	0	0,00	Fac	2	0,9
Zoo	0	0,00	Zoo	3	1,3
TOTAL O	0	0,00	TOTAL O	12	5,1

PCV: Profesional Clínico Veterinario; FRC: Hospital Clínico Veterinario-Fundación Rof Codina; CL: Otro Profesional Clínico Libre.

A: Administración; J: Juzgado; MA: Medio Ambiente; MR: Medio Rural; Pe: Pesca.

O: Otros; AD: Asociación de Defensa Animal; Coo: Cooperativas; Fac: Facultad de Veterinaria; Zoo: Zoológico.

P: Particular.

En el apartado de Administraciones, la principal demandante del Servicio con 49 casos es la Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvimento Sostible (83,1% de las demandas dentro del grupo de Administración, lo que supone un 20,8% de las demandas totales). Las demás secciones de la administración son el SEPRONA, la actual Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, los juzgados y la Consellería de Medio Rural. El escaso número de solicitudes por el SEPRONA (1,8%) se explicaría porque, normalmente, ese Servicio remite para su análisis al SATVe sólo aquellas muestras objeto de denuncia.

El menor número de casos, aparece en el grupo denominado Otros (12 casos, 2,7%), que incluye tanto cooperativas, como asociaciones de defensa animal, zoológicos y, finalmente, la Facultad de Veterinaria (departamentos sin representación en el HCV-FRC).

Principales solicitantes de información: consultas.

Con respecto a los demandantes de información consideradas consultas (Tabla 1), se ha adoptado, como criterio, incluir aquellos casos que implican únicamente consultas toxicológicas, y se excluyen aquellos en los que se demanda también el servicio de análisis toxicológico. Así, destaca la enorme importancia del grupo de PCV, con 179 (82,9% del total), en concreto los CL con 161 (74,5%) son los que solicitan la mayoría de las consultas frente a los FRC con 18 (8,3%). A este grupo le sigue el de particulares, con 36 (16,7%), y sólo un 0,5% de las consultas fueron formuladas por las administraciones. El grupo “Otros” no tiene representación en el apartado de consultas.

Principales solicitantes de análisis toxicológicos.

Entre los demandantes de analíticas toxicológicas (Tabla 1), la distribución es similar al de casos totales, siendo el orden de

importancia según el número de solicitudes: profesionales clínicos veterinarios > administraciones > particulares > otros.

Finalmente, se observa la distribución de demandantes, diferenciando dentro de los casos totales, los casos que implican únicamente consultas y aquellos en los que únicamente se solicitan analíticas toxicológicas (Tabla 1). Se puede observar que, en el total de casos, la cifra de solicitudes del Servicio para los particulares es algo inferior (56 casos) a la de las distintas administraciones (60 casos). Se explica porque las administraciones sólo demandan los servicios analíticos del SATVe en caso del hallazgo de algún cadáver (mayoritariamente perros de caza) o de supuestos cebos envenenados. Así, un 25% de las solicitudes de análisis son realizadas por las administraciones (Medio Ambiente mayoritariamente, con un 20,8% del total), mientras que sólo originan un 0,5% de las consultas. En cuanto a los particulares, ocurre lo contrario, es decir, sólo algunos particulares ante una sospecha de intoxicación de un animal, envían directamente sus muestras para la realización de análisis (8,5% del total de analíticas) sin recurrir al veterinario, siendo mayor la proporción de los que realizan alguna consulta (16,7% del total de consultas).

En el Servicio homólogo francés situado en la ciudad de Lyon (CNITV), hasta el año 2001 el orden de demandantes de análisis según el número de casos difiere en que los particulares son los demandantes mayoritarios, seguidos de los PCV; en tercer lugar se sitúan los laboratorios (inexistentes como demandantes del SATVe) y, por último, las Facultades de Veterinaria [6]. No se hace referencia a las administraciones ni a otros colectivos, por lo que se supone que no son usuarios de este Servicio. Sin embargo, se observa una clara evolución de esta casuística, de forma que ya en el año 2004 los PCV constituyen el 75% de las consultas en el servicio galo, los propietarios de animales (sean estos de compañía o producción) el 20%, y la administración el 5% de las consultas [7]. Destacan, también, las consultas realizadas por centros de Toxicología humana, especialmente en niños afectados por exposiciones a productos veterinarios, que no se presentan en el SATVe.

5. Especie animal.

Evolución de casos por especie animal/cebo

Considerando el grupo de las aves (incluyendo las salvajes), el número de muestras anuales se mantuvo prácticamente constante en 4-5, excepto los dos primeros años (2001 y 2002).

En general, con respecto a la fauna salvaje, de no haber ningún caso en 2001 se remitieron 15 en 2006 y 9 en 2007 (incluyendo aves y peces). Por otra parte, la frecuencia de casos constituidos por cebos, también, sufre un incremento de 0 en 2001 a 6 en 2006, continuando esta tendencia al alza, registrándose 13 casos en 2007.

El número de casos remitidos por la Administración, considerando conjuntamente fauna salvaje y cebos, experimentó un incremento de 2 casos en 2001 a 22 en 2007, siendo mayoritarios los análisis relativos a los cebos.

Los casos relativos a los équidos y los denominados como “otra” (sin relación específica con una determinada especie animal), no permiten extrapolar una tendencia clara.

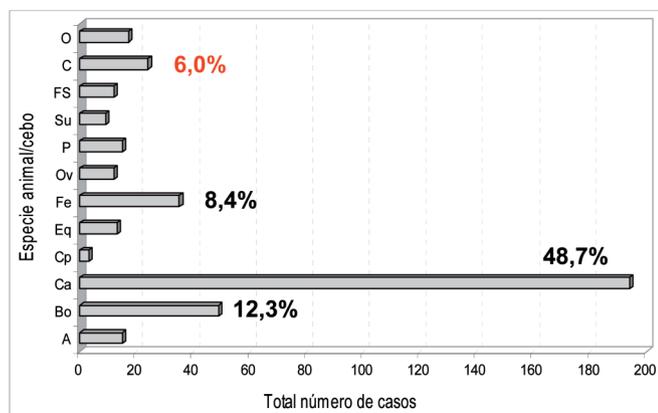
Considerando los rumiantes, los bóvidos ocupan la primera posición en cuanto al número de casos, manteniéndose prácticamente constantes durante los años (10-13 casos/año, a excepción de 2004 en el que se reciben 17). La relación óvidos/cápridos es de 3 a 1. Los cápridos suponen una mínima aportación al número total de casos, siendo sólo 5 en todos los años de estudio, mientras que los óvidos

experimentan un aumento constante, hasta 6 casos en 2007. Con respecto a los bóvidos, el 87,8% de los casos analíticos proceden de Lugo, seguido de A Coruña, Pontevedra y Ourense con porcentajes muy inferiores.

Respecto a los carnívoros domésticos (perros y gatos), mientras los gatos muestran una frecuencia constante (9 en 2001 a 11 en 2006 y 2007), los perros presentan, en general, una clara tendencia al aumento, elevándose las cifras de 21 en 2001 a 43 en 2006 y 56 en 2007, con un gran pico (69 casos) en 2004. Los cánidos originan el mayor número de solicitudes de análisis en tres de las cuatro provincias: A Coruña, Ourense y Pontevedra, sólo superados por los bóvidos en Lugo, que originan el 14,2% del total de los casos analíticos frente al 10,2% de los originados por los cánidos. El número de casos concerniente a los gatos (más bajo de lo que se podía esperar por el número de animales existentes) está ligado tanto a su mayor prudencia como a su especial comportamiento (escondiéndose), que dificulta, como ya se mencionó, su descubrimiento cuando están enfermos. Esta circunstancia se da en el ámbito de poblaciones rurales o pequeñas, en las que el gato suele vivir de una forma asilvestrada [5]. De hecho, en otros centros de atención toxicológica veterinaria más urbanos, como el CNITV francés, la situación, aunque más igualada entre estas dos especies, es contraria, siendo el gato el que origina frecuentemente las solicitudes de análisis post-mortem (83,2%) frente al perro (77,2%) [6].

Distribución de casos por especie animal/cebo

La Figura 4 recoge la distribución de casos según las especies y cebo. La gran diferencia que existe entre la frecuencia de casos toxicológicos originados por la especie canina (48,7%) y la bovina (1,3%) parece una incoherencia al considerar la importancia relativa y absoluta de las actividades ganaderas en nuestra Comunidad Autónoma de Galicia. Sin embargo, podría explicarse por algunas consideraciones que excluyen el punto de vista de la Toxicología Veterinaria, como es la relación coste-beneficio. Ya que si bien para un animal de compañía el desembolso asociado a un cuadro toxicológico suele ser aceptable, no ocurre lo mismo con los animales de renta o producción, impidiendo que muchos de los casos existentes en estos animales lleguen a ser registrados y tratados adecuadamente por el SATVe.



A: Aves; Bo: Bóvido; Ca: Cánido; Cp: Cáprido; Eq: Équido; Fe: Félido; Ov: Óvido;

P: pez; Su: Suido; FS: Fauna Salvaje; C: Cebo; O: Otra.

Ave: Aguilucho, Alcatraz, Arao, Cisne, Gallina, Garza, Gaviota, Oca, Pato, Perdiz

Pez: Mújel, Reo, Trucha

Fauna Salvaje (distinta de Aves y Peces): Invertebrados, Corzo, Gineta, Lobo, Oso,

Zorro

Otra: Alimentos, venenos animales y vegetales, y casos sin relación específica con ninguna especie animal

Figura 4. Distribución de los casos toxicológicos por especie animal/cebo dirigidos al SATVe, en el período 2001-2007.

Con respecto a la diferencia entre el número de casos originados por las especies canina (48,7%) y felina (8,4%), podrían citarse como causas el distinto comportamiento y/o domesticación de ambas especies [3,8].

Según datos relativos al CNITV francés [6], los perros originan también el mayor número de casos, un 35,7%, y los gatos se sitúan en tercera posición originando un 10,9%, apareciendo en segundo lugar la categoría "otra", que hace referencia a todos los casos recibidos sin intoxicación animal conocida, incluidos los supuestos cebos envenenados.

Sin embargo en el SATVe, los cebos son considerados como un grupo independiente, y con el 6,0%, fueron el cuarto grupo en importancia según el número de casos originados por sí solos.

En trabajos recientes [9,10], acerca de la realidad de las intoxicaciones animales en 5 países de la Unión Europea, se muestra que la especie implicada en el mayor número de casos es también la canina, seguida de la felina y, con casuística menor, la bovina.

En estos trabajos destacan tanto el elevado número de casos de los cánidos (83,6%) en el centro antiveneno de Milán (CAV), como el menor porcentaje de los casos de la especie bovina, ya que salvo en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Gante (18%), en los otros centros citados, el porcentaje es mucho menor que el observado en el SATVe (12,3%).

También existen diferencias en cuanto a la fauna salvaje, aunque habría que tener en cuenta la diferente importancia de las especies incluidas en este epígrafe, sobre todo las aves, que constituyen un 26,5% de los casos de fauna salvaje en el SATVe, observándose un porcentaje mucho mayor tanto en informes de la ENVL (École Nationale Vétérinaire de Lyon) [11], con un 43,9%, como en datos más recientes acerca de 5 países de la UE en los que se muestra que las aves suponen un 57% del total de casos de fauna salvaje [12]. Aunque estas cifras pueden ser sólo la punta del iceberg, porque se estima que, en general, sólo se detectan entre el 5 y el 15% de los casos reales de envenenamiento en aves [13].

6. Principales tóxicos detectados

En la mayoría de las solicitudes de análisis no se adjuntaba ninguna especificación acerca de algún tóxico o grupo de tóxicos sospechados, de tal forma que sólo el 6,3% del total de las solicitudes de análisis aportaban una sospecha concreta, incluyendo aquellos casos en los que el agente sospechoso era un fármaco (normalmente sobredosisificación).

Prácticamente la mitad de las analíticas positivas (48%) entre los años 2003-2007 corresponden a dos tóxicos: estricnina y metiocarb, y un fármaco: fenobarbital (Figura 5). Otro barbitúrico, pentobarbital, junto con aldícab, micotoxinas y el metal plomo, fueron detectados de forma similar en un 4% de los análisis. A continuación, con similar frecuencia de aparición (3%), se sitúan carbofurano, cloralosa, cobre, nitratos y nitritos, y warfarina, así como el fármaco ibuprofeno. Finalmente, con un 1% de detección, se encuentran metales como zinc y cadmio, o compuestos orgánicos, tanto tóxicos (allethrin, benzalconio, carbamazepina, etc.), como fármacos (metamizol, ketamina, etc.).

También se puede constatar que los tóxicos detectados de forma constante y con tendencia al alza a lo largo de los años (Figura 6) son tres: cobre, micotoxinas y estricnina. La estricnina evoluciona con el paso de los años: 16% de las analíticas positivas en 2001-2002 [14], 32% en 2003-2006, y 35% en 2007, debido, probablemente, al aumento de remisión de muestras más específicas y mejor

seleccionadas. También tienden a incrementarse las analíticas de micotoxinas: 3% de los tóxicos detectados en los dos primeros periodos (2001-2002, 2003-2006) y 6% en el tercer periodo (2007). El cobre no muestra una tendencia clara, disminuye del primero al segundo periodo del 8 al 2%, y aumenta en el último (6%).

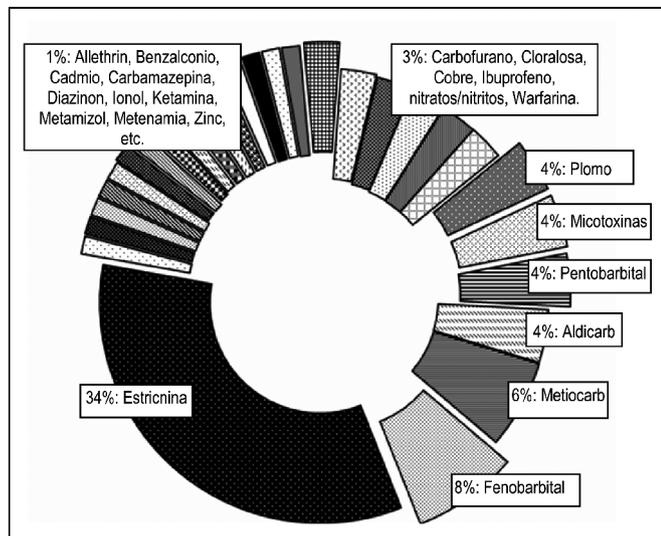


Figura 5. Tóxicos detectados en los análisis realizados en el SATVe, en el periodo 2003-2007.

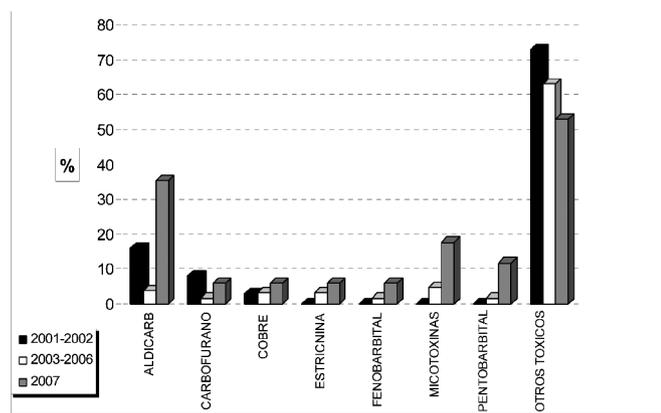


Figura 6. Principales tóxicos detectados en las analíticas realizadas por el SATVe, en el periodo 2001-2007.

En este trabajo, los análisis de micotoxinas se incrementan, contrastando con lo observado en el CNITV, donde se detectaron 0,4% en bóvidos y 1,2% en óvidos durante un período de 11 años (1991-2001) [15].

Durante los dos últimos periodos (2003-2006 y 2007) se observa una ampliación de tóxicos detectados (aldicarb y carbofurano) y fármacos de la familia de los barbitúricos (fenobarbital y pentobarbital). Tanto aldicarb como carbofurano aumentan del 3,2% y el 1,6%, respectivamente, de media en el periodo 2003-2006, al 5,9% del total de tóxicos detectados en 2007. Los barbitúricos, sin embargo, aumentan de una forma mucho más considerable, incrementándose el pentobarbital del 1,6% al 11,8% en el último año, y del 4,8% al 17,7% el fenobarbital.

En Francia, tanto en cebos como en fauna salvaje se aprecian datos diferentes. Respecto a los cebos, aunque éstos aparecen con anticoagulantes y cloralosa, la mayoría de ellos presentaban inhibidores de las colinesterasas, mientras que en el SATVe, el tóxico mayoritariamente encontrado en los cebos fue estricnina, seguida de barbitúricos. Considerando la fauna salvaje (mamíferos), mientras en Francia los tóxicos más detectados fueron los anticoagulantes y los inhibidores de las colinesterasas [16], en el SATVe se detectaron a partes iguales, estricnina, fenobarbital y aldicarb.

Los plaguicidas anticolinesterásicos, también, constituyen los principales causantes de intoxicaciones en fauna salvaje (sobre todo aves) en otros países y Comunidades Autónomas [12,13,17-22]. Entre 2002 y 2006, en Extremadura, dos plaguicidas del grupo de los carbamatos fueron los responsables del 80% de los casos positivos, aldicarb y carbofurano, que fueron detectados en el 47 y 33%, respectivamente, de los casos [23]. Esta diferencia con los resultados obtenidos por el SATVe, posiblemente sea debida a la distinta aplicación/control de las normas legales y el programa Antídoto, así como a la distinta importancia que en ambas Comunidades tiene el sector de la caza, etc., concretamente en Galicia, no existe gran conflicto entre el hombre y la fauna salvaje por la depredación del ganado [24].

Con respecto a la estricnina, los resultados obtenidos en este trabajo discrepan de los aportados por otros autores. Por ejemplo, en el Portland Veterinary Emergency Center del estado de Oregón en Estados Unidos, la estricnina aparece en las intoxicaciones de perros en mínimas cantidades. Lo mismo ocurre en el resto de Europa para la fauna salvaje, donde la estricnina, aunque aparece, está disminuyendo su frecuencia y no es mayoritaria [25].

Considerando por separado las tres grandes categorías de tóxicos establecidas para abordar el presente estudio: plaguicidas, fármacos y otros tóxicos; los plaguicidas suponen el 81,3% de los tóxicos detectados en los cebos y el 69% de los detectados en perro, superior al que reflejan los datos del CNITV (55,5%) [5] y del centro de Portland (36,3%) [25]. Pero en Francia se confirma la intoxicación por plaguicidas en gatos en un 43,4% de los casos, mientras que no se encuentra ningún positivo para esta especie en el SATVe.

En este estudio, los fármacos fueron los responsables del 100% de los casos positivos en gatos. En los cánidos se han detectado en el 23,8% de los análisis realizados y en los cebos en el 18,8%, no siendo encontrados en otras especies.

Con respecto al bloque denominado otros tóxicos, en la especie bovina se identificó el mayor número de los tóxicos englobando entre ellos: nitratos y nitritos, cobre y plomo, micotoxinas, y plantas, que suponen en conjunto el 88,9% de los análisis positivos en esta especie.

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos, en relación a los ítems estudiados puede concluirse: el número total de casos recibidos en el Servicio de Atención Toxicológica Veterinaria (SATVe) durante el periodo 2001-2007 aumentó considerablemente en los primeros años, observándose posteriormente una tendencia al mantenimiento anual, siendo la Comunidad Autónoma de Galicia la que originó el mayor porcentaje de casos (92,2%), ocupando la provincia de Lugo la primera posición. Los profesionales clínicos veterinarios (PCV) fueron los principales demandantes del SATVe frente a la

Administración y los particulares. Los casos que más se remitieron, fueron de la especie canina seguido de la equina, ocupando los félidos la tercera posición. Respecto a las analíticas, los tóxicos mayoritariamente detectados fueron: estricnina, metiocarb y fenobarbital.

Bibliografía

- Melgar Riol MJ, Nóvoa Valiñas MC, García Fernández MA, Pérez López M (2012) Atención clínica en intoxicaciones de animales, ed. USC, editora manuais (14). Santiago de Compostela.
- Romero Romero D, Martínez-López E, María-Mojica P, Navas I, Motas-Guzmán M, Peñalver J, Hernández A, Gómez P, García-Fernández AJ (2006) Evolución del Servicio de Toxicología de la Universidad de Murcia: trece años de estudio de intoxicaciones y envenenamientos (comunicación). *Rev Toxicol* 23: 49.
- Motas Guzmán M, María Mojica P, Romero D, Martínez López E, Navas I, García Fernández AJ (2002) Animales envenenados: La experiencia de diez años del Servicio de Toxicología de la Universidad de Murcia. *Anales de Veterinaria de Murcia* 18: 81-90.
- Motas-Guzmán MC, María-Mojica P, Romero D, Martínez-López E, García-Fernández AJ (2003) Intentional poisoning of animals in Southeastern Spain. A review of the Veterinary Toxicology Service from Murcia, Spain. *Vet Human Toxicol* 45: 47-50.
- Robertson ID, Dorling PR, Shaw SE (1992) A retrospective study of poisoning cases in dogs and cats: comparisons between a rural and an urban practice. *Aust Vet J* 69: 194-192.
- Claire J. (2001) Intoxications des Carnivores Domestiques: Bilan du Laboratoire d'Analyses Toxicologiques de L'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (1994 -1999). Tesis doctoral. Université Claude Bernard. Lyon.
- Keck G, Berny P, Buronfosse F, Pineau X, Vermorel E, Rebelle B (2004) Veterinary Toxicovigilance: objectives, means and organisation in France. *Vet Res Commun* 28: 75-82.
- Pineau X (1999) Approche Épidémiologique des Intoxications des Chiens et Chats. Etude de 40000 Dossiers Enregistrés au Centre National d'Informations Toxicologiques Vétérinaires de Lyon de 1991 à 1997. Tesis doctoral. Université Claude Bernard. Lyon.
- Berny P, Caloni F, Croubels S, Sachana M, Vandenbroucke V, Davanzo F, Guitart R (2010) Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion Animals. *Vet J* 183: 255-259.
- Guitart R, Croubels S, Caloni F, Sachana M, Davanzo F, Vandenbroucke V, Berny P (2009) Animal poisoning in Europe. Part 1: Farm livestock and poultry. *Vet J*, doi:10.1016/j.tvjl.2009.03.002. Pineau en 1999.
- ENVL-Convention ONCFS 2002/85. 2004. Rapport annuel d'activité: du 01-01-2003 au 31-12-2003. ««GreetingLine»» Rédaction. Disponible en <http://www.vet-lyon.fr/servlet/com.univ.collaboratif.utils.LectureFichiergw?C ODE_FICHER=1185353883350&ID_FICHE=871>.
- Guitart R, Sachana M, Caloni F, Croubels S, Vandenbroucke V, Berny P (2009) Animal poisoning in Europe. Part 3: Wildlife. *Vet J*, doi:10.1016/j.tvjl.2009.03.033.
- Soler Rodríguez F, Pérez López M, Hernández Moreno D (2011) Efecto de los pesticidas en aves necrófagas, en Libro de actas del I Seminario sobre Poblaciones de Aves Necrófagas en Andalucía: de la alerta sanitaria a la gestión integrada. Ed. Programa de Conservación de Aves Necrófagas de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.
- Pérez-López M, Nóvoa-Valiñas MC, García-Fernández MA, Melgar-Riol MJ (2004) Two year's activity of the Veterinary Toxicology Attention Service of Lugo, Spain. *Vet Human Toxicol* 46: 47-49.
- Sebastien V (2004) Diagnostic des Intoxications Vegetales chez les Ruminants. Tesis doctoral. Université Claude Bernard, Lyon.
- ENVL-Convention ONCFS 2002/85. 2004. Rapport annuel d'activité: du 01-01-2003 au 31-12-2003. ««GreetingLine»» Rédaction. Disponible en <http://www.vet-lyon.fr/servlet/com.univ.collaboratif.utils.LectureFichiergw?C ODE_FICHER=1185353883350&ID_FICHE=871>.
- Antoniou V, Zantopoulos N, Skartsis D, Tsoukali Papadopoulou H (1996) Pesticide poisoning of animals of wild fauna. *Vet Human Toxicol* 38: 212-213.
- Antoniou V, Zantopoulos N, Tsoukali H (1997) Fatal animal poisonings in norther Greece. *Vet Human Toxicol* 39: 35-36.
- García-Fernández AJ, Jiménez-Montalbán P, María-Mojica P (2006) Cebos utilizados para envenenar fauna silvestre y doméstica en el sureste de España (comunicación). *Rev Toxicol* 23: 52.
- Guitart R, Manosa S, Guerrero X, Mateo R (1999) Animal poisonings: the 10-year experience of a veterinary analytical toxicology laboratory. *Vet Human Toxicol* 41 (5): 331-335.
- María-Mojica P, Romero D, Motas-Guzmán M, Navas I, García-Fernández J (1998) Estudio retrospectivo de casos de envenenamientos de animales de compañía y aves en el Sudeste de España. *Rev Toxicol* 15:105-109.
- Motas-Guzmán MC, María-Mojica P, Romero D, Martínez-López E, García-Fernández AJ (2003) Intentional poisoning of animals in Southeastern Spain. A review of the Veterinary Toxicology Service from Murcia, Spain. *Vet Human Toxicol* 45: 47-50.
- Soler Rodríguez F, Oropesa Jiménez AL, Pérez López M (2006) Análisis de los envenenamientos en fauna silvestre. Situación en Extremadura. *Rev Toxicol* 23: 35-38.
- Cope RB, White KS, More E, Holmes K, Nair A, Chauvin P, Oncken A (2006). Exposure-to-treatment interval and clinical severity in canine poisoning: a retrospective analysis at a Portland Veterinary Emergency Center. *J Vet Pharmacol Ther* 29: 233-236.
- Mateo-Tomás P, Olea PP, Sánchez-Barbudo IS, Mateo R (2012) Alleviating human-wildlife conflicts: Identifying the causes and mapping the risk of illegal poisoning of wild fauna. *J Appl Ecol* 49: 376-385.

Riesgos de los residuos de minería: intoxicación intencional en vacuno por arsénico inorgánico

Soler Rodríguez F*, Hernández Moreno D, Oropesa Jiménez AL y Pérez López M.

Área de Toxicología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad s/n 10003-Cáceres.

Recibido 4 de mayo de 2012 / Aceptado 3 de diciembre de 2012

Resumen: Las intoxicaciones por arsénico en los animales domésticos han sido una de las principales causas de intoxicación, especialmente en el ganado vacuno, aunque han ido disminuyendo desde la prohibición de muchos de sus compuestos y actualmente son anecdóticas. En este trabajo se presenta un caso de intoxicación intencional en ganado vacuno ocurrido en una explotación de Barruecopardo (Salamanca). Siete vacas nodrizas se vieron afectadas, muriendo cuatro de ellas, con un cuadro caracterizado por apatía, postración, pérdida de apetito, intensas diarreas, normotermia y disnea. En la necropsia se observaron fenómenos congestivos y equimosis en corazón y aparato digestivo, y úlceras perforantes en la pared del abomaso. Ante la sospecha de una posible intoxicación por arsénico, se analizaron muestras de hígado y riñón encontrando unos niveles de 13,57 y 8,65 mg/kg respectivamente, que confirmaron el diagnóstico clínico inicial. Un polvo grisáceo, insoluble en agua, que contenía arsénico en una proporción del 65,24 % ($652,4 \times 10^3$ mg/kg) había sido depositado intencionadamente en el suelo donde se colocaba el alimento para el ganado. En el mismo cercado se produjo la muerte de 15 ovejas con un cuadro clínico similar. Este artículo resulta especialmente interesante debido a la ausencia de casos intencionados confirmados de intoxicación por arsénico en ruminantes. Se incide en la importancia del peligro de los residuos abandonados de minería cuando el arsénico es uno de los subproductos comerciales obtenidos.

Palabras clave: intoxicación, vacuno, arsénico, residuos, minería

Abstract: Risks of mining residues: intentional inorganic arsenic poisoning in cattle. Arsenic has been a major cause of poisoning in domestic animals, especially in cattle, though it has been declining since the ban of many of its compounds. Incidents are anecdotal today. This paper reports a case of intentional poisoning in cattle occurred in a farm in Barruecopardo (Salamanca). Seven adult cows were affected. Four died, with a condition characterized by apathy, prostration, loss of appetite, severe diarrhea, normothermia and disnea. At necropsy, congestion and ecchymosis in heart and the digestive system and perforating ulcers in the abomasal mucosa were observed. Arsenic poisoning was suspected and liver and kidney samples were analyzed. High arsenic levels (13.57 and 8.65 mg/kg, respectively) were detected, thus confirming the clinical diagnosis. A grey powder, insoluble in water, and containing arsenic in a proportion of 65.24% (652.4×10^3 mg/kg), had been intentionally poured in the field where cattle were routinely fed. Fifteen sheep died in the same enclosure showing similar symptoms. This article is especially relevant due to the gap of confirmed intentional cases of arsenic poisoning in ruminants. The risk due to residue mining with high content of arsenic is highlighted.

Keywords: poisoning, cattle, arsenic, residues, mining

Introducción

El arsénico es un metaloide o semimetal muy abundante en la corteza terrestre, donde está presente en diversos minerales (menas). Su presencia en las rocas naturales hace que en la fundición de los minerales, tras su extracción minera, se forme sobre todo arsénico elemental y trióxido de arsénico [1-4].

El hombre ha utilizado a lo largo de la historia distintos compuestos de arsénico, sobre todo los óxidos, arsenatos y arsenitos, con diversos fines como insecticidas, herbicidas/defoliantes, conservantes de madera, en baños insecticidas para el ganado, en cebos contra las hormigas o roedores, e incluso con fines medicinales y como aditivos en piensos animales [1-3,5].

Se trata de un elemento de conocida toxicidad desde muy antiguo y que es responsable de intoxicaciones en personas y animales, tanto grandes como pequeños [2,6]. Los casos más frecuentes en animales están relacionados con la exposición accidental a antiguos sacos de plaguicidas arsenicales (fungicidas, herbicidas, insecticidas, rodenticidas), a suelos o aguas contaminados por actividades antropogénicas (pozos de sondeo, minería, plaguicidas, semiconductores, aleaciones, industrias del vidrio, química, etc.), por baños antiparasitarios e incluso por la ingestión de cebos envenenados [3,6-9].

El síndrome tóxico que se presenta varía en función de la forma química del arsénico, de la duración y dosis de exposición. Los arsenicales inorgánicos y trivalentes orgánicos originan un síndrome caracterizado por un grave efecto gastrointestinal (dolor abdominal, atonía y diarrea) y sobre los capilares, con debilidad, ataxia, decúbito y shock, mientras que los arsenicales orgánicos pentavalentes suelen originar un síndrome neurológico [2,8-10].

Esta intoxicación ha sido una de las más frecuentes en los animales, especialmente en vacuno [2,8,11], únicamente superada por el plomo [5], aunque actualmente es rara [4,12-14] debido al descenso del uso de estos compuestos, sobre todo en sus diversas variantes como plaguicidas, que han sido prohibidos por su peligrosidad directa y su persistencia en el medio ambiente. Por ello, es interesante el conocimiento de casos actuales, y en zonas concretas de España que posiblemente puedan originar otros casos con posterioridad.

En este trabajo presentamos un caso clínico diagnosticado de intoxicación intencional por arsénico inorgánico en vacuno, relacionada con la colocación en la zona de alimentación de los animales de residuos de minería incontrolados con un alto contenido en arsénico.

*e-mail: solertox/unex.es

Caso clínico

El caso clínico ocurrió en un cercado de una explotación bovina del término municipal de Barruecopardo (Salamanca) en septiembre de 2008, en el que estaban alojadas 15 vacas, la mayoría en distintos estadios de gestación. En ese momento los animales se alimentaban del pasto y recibían una suplementación a base de forraje que era depositado a mano en una zona concreta más compactada del cercado. Una mañana, el propietario halla muertas a 4 vacas, y otras 3 estaban afectadas mostrando como síntomas más evidentes apatía, postración, pérdida de apetito, intensas diarreas, normotermia en fase terminal y ligera disnea. Tras el aviso a un veterinario clínico, éste inició el tratamiento de los tres animales afectados, ante la sospecha de una posible intoxicación, con la administración i.m. de betaína glucuronato y etanolamida glucuronato (Norepar®), indicado como hepatoprotector y en las intoxicaciones al favorecer la glucuronidación de compuestos tóxicos. Igualmente les administró el antibacteriano marbofloxacino (Marbocyl BovinoS®) ante la posibilidad de tratarse de un proceso infeccioso o en prevención de posibles infecciones. La necropsia de las vacas fallecidas se realizó en el propio cercado observando la presencia de fenómenos congestivos generalizados, ligero edema pulmonar, hemorragias en sábanas y equimosis en corazón y aparato digestivo, entre otros órganos, y zonas de necrosis en la pared del abomaso con el desarrollo incluso de úlceras perforantes. Durante la necropsia el veterinario actuante tomó muestras de hígado y riñón únicamente de uno de los animales muertos, ante la posibilidad de enviarlas para análisis toxicológico. Tras las necropsias, los cadáveres fueron retirados por un servicio autorizado de retirada de cadáveres de acuerdo a lo establecido en la legislación vigente sobre eliminación y transformación de animales muertos en explotaciones ganaderas y sobre subproductos animales no destinados al consumo humano (SANDACH). Ello eliminó la posibilidad de ampliar el número de muestras para análisis químico. Las muestras de hígado y riñón se mantuvieron en congelación hasta su remisión al laboratorio.

Al día siguiente de la retirada de los cadáveres se introdujo en el cercado un rebaño de ovejas, de las cuales 15 aparecieron muertas a la mañana siguiente.

Ante estos hallazgos se hizo una exploración detallada del cercado observando la presencia de un reguero de polvo grisáceo en la zona donde se les suministraba el forraje, lo que evidenciaba que había sido colocado de forma intencionada. Ante este hallazgo los animales presentes en ese momento se sacaron del cercado y, por tanto, de la exposición al polvo sospechoso, lo que produjo una recuperación completa de los animales afectados. A pesar de que la mayoría de las vacas estaban gestantes no se produjeron abortos, aunque los terneros nacidos tras el episodio tuvieron cierto retraso en el crecimiento.

El cuadro clínico observado, la presencia del polvo sospechoso y la proximidad del cercado a una mina abandonada de wolframio, hicieron sospechar de una posible intoxicación por arsénico, ya que era conocido en la zona que este elemento se había comercializado como subproducto de la mina.

Ante esta sospecha, se contactó con el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, donde se remitieron, mantenidas en congelación, las muestras de hígado y riñón tomadas de una de las vacas, así como del polvo grisáceo hallado en la zona de alimentación de los animales, solicitando el correspondiente análisis toxicológico.

Las muestras se analizaron cuantitativamente mediante digestión

ácida de una cantidad aproximada de 1 g de muestra en vasos de teflón TFM de 60 ml en un horno microondas, con control de presión y temperatura en cada uno de los vasos. A cada muestra se añadieron 5 ml de ácido nítrico al 69% de calidad, 10 ml de agua Milli-Q y 2 ml de H₂O₂ al 30% y se sometieron a digestiones en distintas fases a temperaturas de 100, 140, 160 y 200°C. Tras la digestión se evaporaron los extractos, se reconstituyeron en ácido nítrico al 4% hasta 20 ml y se analizó el arsénico en un equipo ICP-AES Perkin-Elmer Optima 5300-DV dotado de un sistema de generación de hidruros. Las condiciones analíticas principales controladas en el ICP fueron el caudal de muestra (205 ml/min), caudal de argón de arrastre (0,8 ml/min), caudal de argón auxiliar (0,5 ml/min), caudal de argón de plasma (15 ml/min), potencia de radiofrecuencia (1300 W) y longitud de onda (188,979 nm).

Los resultados obtenidos fueron de 8,65 mg/kg de arsénico en la muestra de riñón, 13,57 mg/kg en la de hígado y 652,4 x 10³ mg/kg (equivalente al 65,24 % en peso) en el polvo grisáceo.

Discusión

Los resultados analíticos obtenidos en hígado y riñón confirmaron plenamente la sospecha de intoxicación por arsénico en el animal analizado y la altísima proporción del mismo (65,24 %) en el polvo grisáceo identificó el origen de la misma.

El diagnóstico inicial de esta intoxicación se basa en la historia clínica y los síntomas, siendo de ayuda los hallazgos de necropsia, lo que debe confirmarse mediante el análisis químico de arsénico en fluidos o tejidos corporales, además de localizar la posible fuente (agua, alimento, suelos, cenizas...) [3-5,10].

En animales muertos tras intoxicación arsenical los mejores tejidos para analizar son el hígado y el riñón, donde los niveles diagnósticos se sitúan por encima de 8-10 mg/kg [3,5,7], aunque si han pasado varios días desde la exposición hasta la muerte pueden estar entre 2-4 mg/kg [2,5]. El hígado y riñón de animales sanos raramente contienen más de 1 mg/kg de arsénico [15], estando la toxicidad asociada a valores superiores a 3 mg/kg [16,17]. En el animal estudiado, tanto hígado como riñón superaron ampliamente estos valores diagnósticos.

En el caso descrito, la intoxicación fue de carácter agudo con manifestaciones clínicas de tipo digestivo (diarreas) en los enfermos, e intensa irritación sobre la mucosa digestiva y fenómenos vasculares en los cadáveres, lo que concuerda con el cuadro clínico propio de la intoxicación por arsenicales inorgánicos descrito en la bibliografía [2,3,6,10,16]. Los síntomas de las intoxicaciones por arsenicales trivalentes y pentavalentes inorgánicos son similares, estando relacionados con unos importantes efectos sobre el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular, pudiendo tener desde un carácter sobreagudo (con muerte rápida en cuestión de minutos a pocas horas) a uno más dilatado en el tiempo (pocos días), siendo infrecuentes las intoxicaciones crónicas en los animales domésticos [1-3,5-9,16]. En el caso estudiado la mayoría de los animales estaban gestantes, si bien no se produjo ningún aborto, lo que sí se ha señalado en los casos crónicos [6].

Como demostró el resultado del análisis del polvo grisáceo, la colocación del mismo en la zona de depósito del forraje y su posterior ingestión, con el alimento o por confusión con sales minerales, fue la causante de la muerte por envenenamiento de las vacas, y seguramente de las ovejas afectadas. De hecho, informaciones

confidenciales posteriores al veterinario clínico que trató el caso indicaban la sospecha de que el polvo tóxico procediera de unos barriles abandonados en la mina, que contenían un producto con alto contenido en arsénico, y de que la población local tenía conocimiento, no sólo de la existencia de dicho producto en la mina, sino también de la toxicidad del mismo.

El yacimiento de Barruecopardo, situado en la zona noroeste de la provincia de Salamanca, es una importante mina de wolframio a cielo abierto, cerrada desde 1982, aunque está previsto el reinicio de su actividad en un futuro próximo. Las minas de la zona son abundantes en los siguientes minerales: scheelita (mena principal de wolframio), arsenopirita, wolframita y pirita. El proceso metalúrgico comenzaba con una fragmentación y posterior concentración gravimétrica mediante cribas y mesas de sacudidas. Posteriormente, se separaban los óxidos de hierro magnéticamente y el arsénico, en forma de óxido, se recuperaba por tostación del sulfuro (arsenopirita). Durante unos años esta mina representó la mayor producción nacional de wolframio y también se dedicaba a la comercialización del arsénico. Cuando cesó su actividad, parte de las instalaciones fueron demolidas y el acceso de personas a las mismas, y a los restos de productos que quedaron en ellas, ha sido libre. Con mucha probabilidad, el polvo grisáceo utilizado para el envenenamiento de los animales procedía de algunos barriles abandonados que hubieran contenido ese trióxido de arsénico obtenido por tostación de la arsenopirita.

No aparecen en la bibliografía casos confirmados de intoxicaciones intencionadas por arsénico en rumiantes, por lo que el caso aquí presentado tiene un alto interés. El hecho de la aparición del reguero de polvo en el interior del cercado con animales, distante varios metros del vallado, y justo en la zona de esparcimiento del alimento, indican claramente la intencionalidad de la acción. Se ha descrito un precedente bastante similar en Canadá en el que murieron dos terneros y una vaca [18]. En esa ocasión se encontró un pequeño montón de polvo blanco parecido a cal hidratada cerca de una de las líneas de la valla del cercado donde se encontraban los animales, así como restos de un saco de papel que contenía cierta cantidad. El análisis resultó positivo a arsénico y desde el momento que se eliminó el material tóxico del pasto no volvieron a aparecer más casos. La causa de la aparición de ese material pulverulento no se conocía, aunque se apuntó la posibilidad de haber sido colocado allí bien por descuido o de forma maliciosa.

Los humos de las fundiciones o el polvo de las minas puede contener grandes cantidades de arsénico y contaminar los pastizales adyacentes y los suministros de agua potable, por lo que los alrededores de las minas y las fundiciones pueden representar un peligro no intencionado para el ganado que pastorea [1,3,4,6].

La causa más común de intoxicación ha estado representada por la ingestión de líquidos antiparasitarios utilizados para bañar y rociar a los animales [4-6]. Incluso el suelo y los antiguos corrales cercanos a antiguas cubas/piscinas de baños antiparasitarios para animales son aún fuentes de intoxicación por arsénico [2,4]. Otras causas menos frecuentes han sido el consumo accidental de pastos, o hierba segada, tratados con herbicidas arsenicales o las pulverizaciones de insecticidas en los cultivos [1,3,4,6], la incorporación accidental de arseniato cálcico a los concentrados [4], e incluso la ingestión de productos arsenicales que estaban almacenados en el establo desde muy antiguo [19] o desechos tirados en basureros [12,20]. Otro caso estuvo relacionado con la ingestión de una antigua partida de molusquicida en forma de pellets, que estaba almacenado en un establo desde hacía más de 20 años, y que estaba compuesto a base de

metaldehído y arsénico [19]. Entre los casos más recientes confirmados en vacuno hay que destacar un caso en Bélgica en el que tres vacas murieron tras el consumo de cenizas de viejos recipientes de herbicidas arsenicales que habían sido quemados en un prado [21]. Otra causa a tener en cuenta es la exposición a cenizas de madera tratada con arseniato de cobre cromado como conservante de la madera [11]. El vacuno, especialmente si está carente de sales, ingiere rápidamente estas cenizas debido a su sabor salado [6,10,17]. No hay que descartar la posibilidad de que los animales que padecieron la intoxicación en el caso estudiado estuvieran sufriendo una carencia de sales minerales, probablemente por estar la mayoría en gestación, lo que les pudo hacer lamer el polvo arsenical y por tanto padecer la intoxicación.

Hay que tener en cuenta que son muchos los factores que influyen en la toxicidad del arsénico, incluyendo el tamaño de partícula en el caso de materiales sólidos. En el caso que nos ocupa el origen de la intoxicación era material de alta riqueza en arsénico, finamente molido, en forma de polvo, de pequeño tamaño de partícula, lo que favorece la absorción digestiva o cutánea del arsénico [2,3,5].

En el caso descrito no se llegó a realizar tratamiento específico contra la intoxicación por arsénico ya que los animales se sacaron rápidamente de la parcela problema, evitando el consumo de más polvo gris, lo que produjo la recuperación de los tres animales enfermos. Tras el diagnóstico analítico definitivo se retiró completamente el polvo grisáceo de la parcela, que se volvió a ocupar con los animales, a partir de entonces sin problemas.

El tratamiento farmacológico efectuado (hepatoprotectores, antibacterianos) se encuadra en medidas de carácter general y preventivo, lo cual inicialmente es correcto al no disponer en un primer momento de un diagnóstico definitivo. De hecho, en los rumiantes, el tratamiento de los animales afectados por intoxicación por arsénico es principalmente sintomático y de soporte, con una atención especial a la terapia de fluidos y al apoyo cardiovascular para corregir el desequilibrio electrolítico y la deshidratación [10].

Además del hecho de la intencionalidad de la intoxicación, hay que destacar en este trabajo el enorme peligro potencial y la necesidad de medidas de seguridad respecto a los residuos de las minas una vez finalizada su explotación. Particularmente en aquellas en las que se obtuviera un subproducto muy rico en arsénico, que fuera vendido como fuente adicional de ingresos. Tampoco conviene despreciar las posibles repercusiones para la salud pública del consumo de alimentos animales procedentes de áreas próximas a fundiciones o minas que contaminan los pastos de los alrededores con arsénico [4,22]. Si bien la carne de animales supervivientes se ha indicado que es segura para el consumo humano [3], se han encontrado niveles de arsénico superiores a los niveles permisibles en carne y vísceras de vacunos que habían recibido a través del aire cenizas procedentes de centrales termoeléctricas [4].

Conclusiones

Se describe un caso clínico de intoxicación intencionada por arsénico inorgánico en vacuno, por consumo de residuos de minería, de gran interés debido a la inexistencia en la bibliografía de casos confirmados de intoxicaciones intencionadas por arsénico en rumiantes.

La existencia de residuos de minería abandonados con altos contenidos en arsénico es un hecho que puede ocurrir en

explotaciones mineras abandonadas, lo que supone un grave riesgo para los animales que los pueden ingerir, y también para el medio ambiente cercano, pudiendo pasar al agua y otros alimentos creando un problema de salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ensley S (2004) Arsenic. En: Plumlee HK (ed) *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby Inc. St Louis. pp 193-195.
2. Garland T (2007). Arsenic. En: Gupta RC (ed) *Veterinary Toxicology. Basic and clinical principles*. Elsevier Inc, St Louis. 418-421.
3. Hatch RC (1988) Poisons causing abdominal distress or liver or kidney damage. En: Booth NH, McDonald LE (ed) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Iowa State Univ Press, Ames. 1102-1107.
4. Humpreys DJ (1990). *Toxicología veterinaria*. 3ª edición. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid. 21-27.
5. Buck WB, Osweiler G y Van Gelder GA (1981) *Toxicología veterinaria clínica y diagnóstica*. Editorial Acribia, Zaragoza. 347-358.
6. Blood DC, Radostits OM (1992) *Medicina veterinaria. Libro de texto de las enfermedades del Ganado Vacuno, Ovino, Porcino, Caprino y Equino*. 7ª Edición, Volumen II. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. 1346-1350.
7. Pouliquen H (2004) *Toxicologie clinique des ruminants*. Éditions du Point Vétérinaire. Maisons-Alfort. 170-171.
8. McGuirk SM, Semrad SD (2005) Toxicologic emergencies in cattle. *Vet Clin Food Anim* 21:729-749.
9. Osweiler GD (1996) *Toxicology*. Lippincott Williams & Wilkins, Media. 181-185.
10. Poppenga RH (2011) Commercial and industrial chemical hazards for ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 27: 373-387.
11. Hullinger G, Sangster L, Colvin B, Frazier K (1998) Bovine arsenic toxicosis from ingestion of ashed copper-chrome-arsenate treated timber. *Vet Hum Toxicol*. 40:147-148.
12. Faires MC (2004) Inorganic arsenic toxicosis in a beef herd. *Can Vet J* 45:329-331.
13. Guitart R, Croubels S, Caloni F, Sachana M, Davanzo F, Vandenbroucke V, Berny P (2010) Animal poisoning in Europe. Part 1: Farm livestock and poultry. *Vet J*. 183:249-254.
14. McLean MK, Hansen SR (2012) An overview of trends in animal poisoning cases in the United States: 2002-2010. *Vet Clin Small Anim* 42:219-228.
15. M. López Alonso, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernández, J. L. Benedito (2002). Interacción entre metales tóxicos y esenciales en ganado vacuno de Galicia. *Rev Toxicol* 19:69-72.
16. *Manual Merck de Veterinaria* (2007). Ed. Océano-Centrum, Barcelona. 2305-2308.
17. Staples ELJ (1965). Ash from arsenic-treated (tanalised) timber a danger to stock. *New Z Vet J* 13: 65-67.
18. Davey DC (1941) Arsenic poisoning in cattle. *Can Vet J* 5: 268-269.
19. Valentine BA, Rumbelha WK, Hensley TS, Halse RR (2007) Arsenic and metaldehyde toxicosis in a beef herd. *J Vet Diagn Invest* 19:212-215.
20. Neiger R, Nelson N, Miskimins D, Caster J, Caster L (2004) Bovine arsenic toxicosis *J Vet Diagn Invest* 16:436-438.
21. Vandenbroucke V, Van Pelt H, De Backer P, Croubels S (2010) Animal poisonings in Belgium: a review of the past decade. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79:259-268.
22. Bruce SL, Noller BN, Grigg AH, Mullen BF, Mulligan DR, Ritchie PJ, Currey N, Ng JC (2003) A field study conducted at Kidston Gold Mine, to evaluate the impact of arsenic and zinc from mine tailing to grazing cattle. *Toxicology Letters* 137:23-34.

Posible tratamiento con lípidos intravenosos de carnívoros domésticos intoxicados con lactonas macrocíclicas

Buronfosse-Roque F*¹, Herberg-Rebelle B¹, Queffélec S¹, Pérez-López M² y Pineau X¹

¹CPVL – VETAGRO SUP. Campus Vétérinaire de Lyon. 1 Avenue Bourgelat. 69280 Marcy l'Etoile (Francia). ²Unidad de Toxicología, Fac de Veterinaria de Cáceres (UEX). Avda de la Universidad s/n. 10071 Cáceres (España).

Recibido 7 de mayo de 2012 / Aceptado 1 de diciembre de 2012

Resumen: Las emulsiones lipídicas, utilizadas inicialmente en la alimentación parenteral, están siendo propuestas, desde hace algunos años, en el tratamiento de las intoxicaciones humanas por anestésicos locales. Poco a poco, se van citando algunos casos aislados en la literatura científica. El Centro de Fármaco-vigilancia Veterinaria de Lyon (Francia) ha propuesto esta terapéutica en varias tomas y ha analizado la evolución de 6 casos de intoxicación de perros tratados con la administración intravenosa de emulsión lipídica. Los resultados parecen suficientemente esperanzadores para que esta terapéutica sea sistemáticamente propuesta en el futuro tras una ingestión o tratamiento accidental con ivermectina o moxidectina. Sería aconsejable realizar en el futuro nuevas evaluaciones sobre un mayor número de casos.

Palabras clave: Emulsiones lipídicas, ivermectina, moxidectina, perro, tratamiento, eficacia.

Abstract: Possible treatment of macrocyclic lactone poisoning in pets with intravenous lipids. Intravenous lipid emulsions (ILE), intended for parenteral nutrition, have been advocated for several years as therapy of humans poisoning by local anesthetics. Their use have been progressively extended to the therapy of other toxicoses, including poisoning of dogs by macrocyclic lactones, with anecdotal reports cited in the literature. The Veterinary Pharmacovigilance Centre of Lyon advocated ILE on several occasions. ILE was used in 6 dogs intoxicated by macrocyclic lactones. Results seem sufficiently promising to encourage the systematic use in case of ivermectin or moxidectin toxicosis (accidental ingestion of oral paste or tablets for horses, or inadvertent overdose). It would be advisable in the future further evaluation on a large number of cases.

Keywords: Lipid emulsions, ivermectin, moxidectin, dog, therapy, efficacy.

Introducción

Cada año, el Centro de Farmacovigilancia Veterinaria de Lyon (CPVL) se enfrenta a intoxicaciones por lactonas macrocíclicas en los carnívoros domésticos, con un pronóstico no pocas veces reservado. La bibliografía menciona, tanto en el ser humano como en animales, la utilización de emulsiones lipídicas para el tratamiento de ciertas intoxicaciones medicamentosas, entre las que se encuentran aquellas inducidas por lactonas macrocíclicas.

Con el fin de delimitar mejor el interés de esta terapéutica, este artículo se basa en el análisis de 6 casos de perros intoxicados por avermectinas tratados mediante la administración intravenosa de emulsiones lipídicas a lo largo del año 2011.

*e-mail: cpvl/vetagro-sup.fr

Lípidos intravenosos: de la nutrición parenteral al tratamiento de las intoxicaciones

Las emulsiones lipídicas son utilizadas en la alimentación parenteral, en reanimación o incluso como solventes para los sedantes liposolubles, como por ejemplo el propofol. Las disponibles en el mercado francés se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de medicamentos de emulsiones lipídicas disponibles en Francia (2001).

	Composición	Presentación	Laboratorio
Intralipide®	Aceite de soja 20%	100, 200, 500ml	Fresenius Kabi
Oliclinomel®	Aceite de soja 20% + oliva 80%	1,5 / 2 litros	Baxter
Ivelip 20%®	Aceite de soja 20%	250 / 500 ml	Baxter
Medialipide®	Aceite de soja 20%	100, 250 / 500 ml	Braun Med

Desde 1998, numerosas publicaciones proponen los lípidos intravenosos para el tratamiento de las intoxicaciones humanas por anestésicos locales, fundamentalmente ante la bupivacaína. Diversas investigaciones experimentales, especialmente el trabajo de Weinberg, citado en varios artículos [2,3] permitieron evidenciar que un tratamiento previo de ratas con una emulsión lipídica aumentaba de manera dosis-dependiente la dosis de bupivacaína causante de asistolia. Con posterioridad, un ensayo de eficacia terapéutica ha demostrado que la supervivencia de un grupo tratado con esta emulsión era marcadamente mejor que la del grupo tratado de forma clásica con adrenalina. Así mismo se han citado casos de utilización exitosa de lípidos intravenosos en el tratamiento de la intoxicación por compuestos con acción cardíaca (antidepresores, anticonvulsivos, antiarrítmicos).

En tanto que los datos concernientes a los anestésicos locales son numerosos, es cierto que los ensayos realizados en otras intoxicaciones son más heterogéneos. Por ejemplo, los efectos cardio-circulatorios de la clomipramina en la rata son dominados con la administración de una infusión lipídica [4], mientras que para el propanolol, los efectos cardíacos directos (complejo QRS alargado) son mejorados pero no se modifica la supervivencia [5].

Actualmente puede explicarse parcialmente el modo de actuación de las emulsiones lipídicas. Se han postulado tres hipótesis principales para explicar la actividad de las emulsiones lipídicas sobre los compuestos cardiotropos [3].

La primera es aquella que ha presidido los primeros ensayos de Weinberg sobre la bupivacaína, y denominada como "efecto sifón": la emulsión lipídica aumentaría la eliminación del anestésico a partir del tejido cardíaco y del plasma. Un estudio realizado en laboratorio

ha testado la solubilidad de los anestésicos locales en dos tipos de emulsiones lipídicas: a baja concentración, la solubilización es lineal, pero una vez superados los 64mg/l, se observa un fenómeno de meseta. La emulsión más eficaz sería aquella conteniendo ácidos grasos de cadena larga (Intralipide®), lo que permitiría una mejor captación de los anestésicos locales y por tanto poseyendo una eficacia superior [6]. Este estudio parecería reforzar la hipótesis de una captación de la molécula de anestésico local por las gotitas lipídicas [7].

Un estudio publicado en 2010 [8] testando el secuestro plasmático de la amiodarona por la inyección intravenosa de una emulsión lipídica en porcino va también en el mismo sentido.

La segunda de las hipótesis concierne a una acción sobre el metabolismo miocárdico: el miocardio utiliza en reposo principalmente ácidos grasos, mientras que en situaciones de estrés recurre fundamentalmente a los glúcidos (carbohidratos), asociado todo ello a una cierta insulino-resistencia. La eficacia de las emulsiones lipídicas resultaría o bien de una reorientación del metabolismo hacia los ácidos grasos de cadena larga o a una estimulación directa de la producción de insulina.

La tercera hipótesis refiere una acción sobre los canales iónicos. El mecanismo más plausible sería la activación de los canales cálcicos, lo cual permitiría explicar la rápida mejoría hemodinámica a menudo observada tras la administración intravenosa.

Teniendo en cuenta la dificultad para discernir el modo de acción de la emulsión lipídica, los protocolos propuestos en medicina humana son muy empíricos. El esquema más a menudo propuesto parte de la administración de un bolo de 100 ml (aproximadamente 1,5 ml/kg) seguidos eventualmente de una perfusión de mantenimiento a 0,2-0,5 ml/kg/minuto. Será la respuesta clínica la que determine el mantenimiento o la suspensión de este tratamiento.

La administración intravenosa de lípidos no está, sin embargo, desprovista de efectos indeseables posibles, incluso tras una administración de corta duración, como por ejemplo tromboflebitis, embolias grasa o hipertensiones pulmonares [9,10].

Ensayos de utilidad en medicina veterinaria

Teniendo en cuenta diferentes estudios realizadas en seres humanos concernientes al empleo de emulsiones lipídicas, así como ensayos realizados en laboratorio, esta misma aproximación terapéutica ha sido testada en medicina veterinaria. De esta forma, O'brien [11] relata el tratamiento de un gato intoxicado por la inyección de lidocaína. Teniendo en cuenta el probable mecanismo de acción de captación de moléculas liposolubles en las gotitas lipídicas, se han realizado ensayos terapéuticos en carnívoros domésticos, en numerosos casos de intoxicaciones medicamentosas (anestésicos locales, clomipramina, verapamil, haloperidol, amlodipina, propranolol, moxidectina) [10,12]. En teoría, las emulsiones lipídicas podría ser beneficiosas para la intoxicación por todas las moléculas lipofílicas (coeficiente de partición octanol/agua, $\text{Log } P > 1$) [10]. De esta forma, las emulsiones lipídicas merecerían ser testadas en las intoxicaciones por permectrina ($\text{Log } P = 6,5$).

Entre el conjunto de medicamentos citados como potencialmente tratables mediante el uso de emulsiones lipídicas, una categoría parecería ser especialmente interesante, y es aquella constituida por las lactonas macrocíclicas (ivermectina, $\text{Log } P = 3,5$, moxidectina, $\text{Log } P = 4,1$).

Una publicación, en *Veterinary Record*, menciona el caso de un gato que había recibido una sobredosificación (no se precisaba) de

ivermectina, presentando 18 horas más tarde temblores generalizados. Estos síntomas fueron momentáneamente resueltos mediante la administración de propofol, hasta la recuperación de la consciencia del animal. La administración de Intralipide (emulsión lipídica al 20 %) durante 30 minutos (a 0,25 ml/kg/ minuto) tras un primer bolo de 1,5 ml/kg permitió el restablecimiento duradero del gato y su regreso a casa con los propietarios el día siguiente [13].

Crandell y Weinberg [14], en el *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, relatan el caso de un perro joven, raza Jack Russel Terrier, de 3,2 Kg de peso, previamente tratado de una demodectia con ivermectina, sospechándose que además había ingerido un vermífugo para caballos en cuya composición entraba la moxidectina. 45 minutos tras la ingestión sospechada, el cachorro presentó vómitos, ataxia, temblores y convulsiones tónico-clónicas. Se instaura un primer tratamiento sintomático de urgencia (diazepam, perfusión), lo que permite controlar las convulsiones, pero el perro entra en coma, con bradicardia, mejorada mediante glicopirrolato. El perro recibe un primer tratamiento con emulsión lipídica 10 horas tras la ingestión (Intralipide 20 %, bolos de 2 ml/kg, seguidos de 4 ml/kg/hora, durante 4 horas). El perro, hasta ese momento mantenido bajo ventilación asistida, puede por fin ser extubado, 25 horas tras la ingestión. Sin embargo, el cachorro presenta todavía contracciones musculares tónico-clónicas, cada vez más marcadas, con lo cual se instaura un segundo tratamiento lipídico, con un aporte todavía más rápido (0,5 ml/kg/minuto, durante 30 minutos). Desde el final de la perfusión, el perro está consciente y es capaz de digerir (algo bueno, desde el punto de vista de la evolución). Tras 48 horas, el perro es devuelto a sus propietarios, en un estado perfectamente normal.

Utilización de emulsiones lipídicas en intoxicaciones por lactonas macrocíclicas registradas en el CPVL.

El CPVL registra cada año numerosas intoxicaciones con esta familia de agentes químicos, sea por el tratamiento en razas de perro especialmente sensibles (fuerte prevalencia de la mutación del gen MDR1: Border collie, Pastor australiano,...), por sobredosificación terapéutica, o incluso por la ingestión accidental por parte de los perros de especialidades destinadas a équidos o bóvidos. En 2011 han sido 201 las llamadas registradas en el CPVL concernientes a carnívoros domésticos y lactonas macrocíclicas (intoxicaciones, sospechas de efectos secundarios indeseables o ingestiones asintomáticas). Entre todos ellos, se consideran aquellos casos en los que se observó una sintomatología nerviosa, consecutivos a sobredosis con especialidades destinadas a bovinos o equinos, tanto por ingestión accidental como por administración errónea por los propietarios (29 perros, 2 gatos; ivermectina en 24, moxidectina en 6 y eprinomectina con otros 6).

Si nos interesamos en la sintomatología nerviosa presentada, se observa una clara predominancia de los problemas neuromusculares (temblores, convulsiones, hiperestesia), de la marcha (ataxia, paresia/parálisis), de la visión (ceguera/amaurosis) y de la consciencia (letargia, coma), tanto en perros como en gatos.

En estos accidentes se encuentran implicadas numerosas razas de perros, y no solamente las razas más comunes habitualmente consideradas con una fuerte incidencia de la mutación MDR1 (Tabla 2).

Teniendo en cuenta el número de casos de intoxicación por lactonas macrocíclicas registrados en el CPVL y la gravedad de los problemas encontrados, ha parecido pertinente proponer a los veterinarios, tras la comunicación telefónica, la posibilidad de un tratamiento con los lípidos intravenosos, al menos desde el momento en que el pronóstico

parecía reservado. En efecto, no existe ningún antídoto a estas moléculas y las medidas terapéuticas habituales (perfusión, carbón activado) son frustrantes en casos de intoxicaciones severas.

Tabla 2. Razas de perros en que se han referenciado intoxicaciones por avermectinas en el año 2011.

Razas de perro	Número de casos
Jack Russell Terrier	8
Caniche x Bichon	1
Yorkshire Terrier	3
Border Collie	3
Beauceron	1
Berger australiano	3
Bouledogue Francés	1
Fox Terrier	1
West Highland White Terrier	1
Pastor belga Malinois	1
Pinscher enano	1
Setter inglés	1
Dálmata	1
Epagneul breton	1
Basset Hound	1
Pastor de Anatolia	1

En 2011 este tratamiento ha sido propuesto en aproximadamente el 50 % de los casos de intoxicación de carnívoros domésticos por los medicamentos destinados a las especies bovinas y equinas (es decir, casos considerados de pronóstico reservado a muy reservado). Tras la llamada, el artículo ya referido de Crandell y Weinberg [14] ha sido remitido por correo electrónico, con una lista de los nombres comerciales de los principales productos comerciales encontrados en Francia junto al protocolo de tratamiento (Tabla 3).

Tabla 3. Protocolo de utilización de intralípidos en caso de intoxicación.

Intralípido 20 %: - Bolos intravenosos: 1,5 ml/kg en 1 minuto - Seguir con una perfusión de 0,25 ml/kg/min en 30 min - Ante la ausencia de una buena respuesta, 0,5 ml/kg/min en 30 min
--

El tratamiento a base de emulsiones lipídicas sólo ha podido ser instaurado en 6 casos, debido a la dificultad para conseguir las especialidades en las farmacias de la zona. Todos estos casos correspondieron a perros (7 animales en total). Los problemas presentados por los animales antes del tratamiento estaban de acuerdo con los clásicamente encontrados en los casos de intoxicación por avermectinas. Solamente 2 de los 6 casos correspondieron a perros en los cuales la raza no era considerada como importante en cuanto a tener prevalencia de mutación del gen MDR1 (en concreto, Yorkshire y Basset Hound). Tras el tratamiento con la emulsión lipídica, 4 animales sobrevivieron y 3 fallecieron.

Caso 11CPVL0051:

Dos perras de raza Pastor australiano caen enfermas en un box donde un caballo había sido tratado con vermífugo a base de una pasta de ivermectina. 2 horas más tarde, uno de los perros tiene ataxia, con incoordinación motriz, así como un descenso de la visión (a pesar de mantener los reflejos pupilares normales), ligera midriasis y

ansiedad. Se sospecha firmemente la ingestión por parte de los perros de restos de la pasta oral vermífuga destinada a los caballos (los caballos rechazan una parte de su medicamento de forma habitual). 8 a 10 horas tras la ingestión posible, el primer perro atendido entra en coma y el segundo, hasta ese momento asintomático, presenta una paresia posterior y vómitos. 24 horas tras la ingestión posible, el segundo perro, sometido a perfusión, está totalmente recuperado; mientras que el primero sigue en coma. Se instaura una perfusión con Medialípides (0,5 ml /kg y minuto, durante 30 min). El veterinario que trata a los animales no evidencia ninguna mejoría, y el animal fallece, probablemente por una falsa ruta (no se realiza necropsia)

Caso 11CPVL232:

Una perra Border Collie de 3 años y pesando 20 kg ingiere un comprimido a base de ivermectina destinado a tratar un asno. Horas más tarde, el perro titubea, saliva, no ve correctamente y tiene midriasis. Sin embargo, está todavía consciente y responde a la voz. La administración de lípidos por vía venosa conduce al restablecimiento en una hora (el nombre y la dosis de la especialidad no son precisados). Tras dos horas, sin embargo, se instaura una amaurosis que persiste durante 3 días.

Caso 11CPVL569:

Un perro Basset Hound pesando 34 kg recibe accidentalmente 1 comprimido de ivermectina destinado a los caballos. 2 a 4 horas más tarde, presenta ataxia, salivación, vómitos, amaurosis y convulsiones. El animal recibe entonces diazepam, perfusión con Ringer Lactato®, atropina y anestesia con medetomidina, ketamina y buprenorfina. Al día siguiente, el animal está en coma. Pasando un día más, el animal, siempre en coma, recibe Intralípido al 20% (450 ml durante 35 min). La mejora es excelente y el animal regresa a su casa. D3: Una visita de control confirma la completa curación.

Caso 11CPVL1007:

Una perra Pastor australiano de 1 año y pesando 30 kg ingiere una parte de la dosis de ivermectina rechazada por un caballo durante un proceso de vermifugación. En las horas siguientes, la perra presenta problemas neurológicos (sin más precisión disponible), evolucionando hacia el coma total en el momento del examen clínico del veterinario. El animal es sometido a perfusión (Ringer-Lactato® + Glucosa 5%), y se realiza un sondado gástrico con la administración de carbón vegetal activado. Se instaura una perfusión de Intralípido a las 12 horas tras el comienzo de los síntomas (500 ml), pero el animal muere a las 24 horas tras su admisión.

Caso 11CPVL1484:

Una perra Yorkshire terrier, de 2 años con un peso de 3 kg recibe 25 mg de ivermectina (2,5 ml de una solución de 1g/100 ml) por vía subcutánea. El propietario se da cuenta inmediatamente de su error y lleva a la perra a la clínica. En su admisión, la perra está viva sin ningún signo clínico. El producto parece totalmente reabsorbido en el sitio. El paciente recibe carbón vegetal activado y una perfusión de Ringer Lactato. 2 horas y 15 minutos tras la inyección accidental, la perra recibe 6 ml de Intralípido junto con una perfusión lenta a razón de 1 gota cada 15 segundos. 3 horas tras la inyección, la perra posee poca actividad, ciertos temblores y ligera ataxia. Estos problemas se repiten a las 2 horas. Al día siguiente por la mañana, la perra muestra una ligera mejoría, pero con midriasis, no ve bien cuando está bajo buena iluminación. Se realiza una nueva administración de Intralípido (1 hora de perfusión). 4 días más tarde, la perra tiene siempre midriasis con una lesión persistente a plena luz, pero sin ningún problema más.

Caso 11CPVL1938:

Una perra Border Collie con un peso de 20 kg y 5 años se presenta a las 10h30 en la clínica con convulsiones, opistótonos, abdomen tenso y salivación. Se sospecha que ha lamido a unas cabras que habían sido tratadas por vía cutánea con eprinomectina. Se instaura un tratamiento sintomático (diazepam, glicopirrolato, perfusión de Ringer Lactato®, butilescolamina/dipirona, protector hepático, corticoide). Tras una breve fase de mejoría clínica, el animal sufre una recaída, recibiendo una inyección de doxapram, y es anestesiado con tiletamina/zolazepam. A las 18h, el perro recibe una perfusión de Oliclinomel (500 ml). Al día siguiente, el estado clínico del animal no ha mejorado y a pesar de los tratamientos instaurados, tiene lugar la muerte 48 horas tras la admisión.

Discusión

En los 6 casos registrados en el CPVL que hacen mención al empleo de la emulsión lipídica, se observan 3 casos con remisión y 3 con mortalidad: 4 animales se curan, frente a 3 que fallecen. Está claro obviamente que el número de casos no permite obtener una estadística válida. Lo que sí se puede hacer es, a partir de estos datos, y comprándolos con los de la literatura ya existente, es aclarar o evidenciar ciertas tendencias.

El primer punto a aclarar es la dificultad de los veterinarios prácticos para encontrar estas emulsiones lipídicas. Las especialidades disponibles en Francia se agrupan en la Tabla 1. Su composición es variable, al igual que su eficacia. Según Estebe, Intralipide (emulsión de triglicéridos de cadena larga procedentes del aceite de soja) es la especialidad que parece poseer el potencial más importante para el tratamiento de intoxicaciones pero también es la peor absorbida y tolerada en la alimentación parenteral. Medialipide contiene también aceite de soja (ácidos grasos de cadena media), mientras que Oliclinomel es una emulsión a base de aceite de oliva. Estas especialidades están disponibles sobre todo en farmacias hospitalarias, eventualmente en farmacias de oficina, pero raramente se guardan en stock.

En los casos registrados en el CPVL, el Medialipide ha sido utilizado una vez, al igual que Oliclinomel, mientras que Intralipide 3 veces y en el sexto caso, el nombre de la especialidad es desconocido, al igual que sus condiciones de utilización.

A la luz de los casos registrados, parece que la especialidad Intralipide ha sido la más fácilmente accesible y es la más recomendada en los protocolos de tratamiento de las intoxicaciones por los anestésicos locales en el ser humano (Lipidrescue) y para la cual los datos son más numerosos.

Los 3 casos registrados con esta especialidad utilizada en el tratamiento se han asociado a una intoxicación por ivermectina, 2 casos evolucionaron favorablemente, y el último desfavorablemente.

El caso de mortalidad se asoció a la administración de Intralipide según el protocolo propuesto por el CPVL pero en un animal en coma y en el cual los problemas evolucionaron muy rápidamente. Se trataba de un Pastor australiano, raza conocida por tener una fuerte predisposición a la mutación del gen MDR1 y por tanto con fuerte sensibilidad. La cantidad de ivermectina recibida no era evaluable.

En los dos casos con curación, una de ellas era un animal tratado tras 24 horas de coma (pero con una instalación progresiva en este estado comatoso) y la otra en un animal tratado de forma preventiva. En los dos casos, la cantidades de ivermectina administradas son muy

importantes, muy por encima de las dosis tóxicas, pero los perros no pertenecían a esas razas que poseen una fuerte incidencia de mutación del gen MDR1.

El animal que poseía el peor estado general en el momento de la administración del Intralipide vio mejorar su estado de forma espectacular y definitiva con una remisión total de los problemas en pocas horas. El perro tratado a título preventivo había incluso presentado problemas (ataxia y temblores transitorios durante dos horas, midriasis persistente durante varios días) pero es importante señalar que la dosis de ivermectina administrada estaba cerca de 8 mg/kg, es decir 40 veces una dosis terapéutica.

En estos dos casos, la evolución de la intoxicación parece haber sido muy favorablemente influenciada por la inyección de Intralipide, sin efectos indeseables detectados

El Medialipide ha sido utilizado en un solo animal, ya en coma tras 24 horas en el momento de la instauración del tratamiento. Si la ingestión de ivermectina es probable, no es cierta y las cantidades ingeridas no son evaluables. Los síntomas aparecieron muy rápidamente y el coma se instaló de manera duradera en el animal perteneciente a una raza de fuerte predominancia de mutación del gen MDR1. El empleo de Medialipide no ha sido seguido por ningún signo clínico.

En el caso mencionado de la utilización de Oliclinomel, el perro tratado presentaba convulsiones tras un posible lamido de eprinomectina. Incluso si el Oliclinomel no forma parte de las emulsiones lipídicas reconocidas como las más eficaces en término de tratamiento de las intoxicaciones, este caso contiene demasiadas incertidumbres en cuanto al origen de los problemas y las dosis posibles ingeridas para juzgar la eficacia o ineficacia posibles. Es importante señalar que el perro era un Border Collie, raza de fuerte predominancia de la mutación genética ya mencionada.

El último caso de la serie describe la administración de una emulsión lipídica de nombre desconocido, habiendo permitido un restablecimiento extremadamente rápido en una intoxicación de un perro Border Collie (raza sensible) por fuerte dosis de ivermectina. A pesar de la ausencia de datos sobre las dosis administradas o el nombre de la especialidad, el restablecimiento bastante poco esperado del animal en 1 hora tras la administración hace pensar en una eficacia del tratamiento según se preconiza desde el CPVL.

Conclusión

El número de casos registrados en el CPVL en los cuales la administración de emulsiones lipídicas ha podido ser testada tras intoxicaciones por avermectinas en carnívoros domésticos es reducido. Es por tanto imposible extraer conclusiones totalmente fiables. Sin embargo no es imposible vislumbrar una eficacia terapéutica o comparar la eficacia de las diferentes emulsiones presentes en el mercado francés. Se han constatado, eso sí, resultados espectaculares con la remisión muy rápida tras la administración de estas emulsiones, y muy especialmente el Intralipide 20%, incluso con perros pertenecientes a raza conocidas por poseer una fuerte incidencia de la mutación del gen MDR1, sin que pueda ser avanzado un efecto "antidótico". Sobre la pequeña cantidad de casos estudiados, no se ha mencionado ningún efecto indeseable atribuible a las emulsiones lipídicas.

Estos primeros resultados permiten incluir de manera sistemática el tratamiento con emulsiones lipídicas en el protocolo de tratamiento de las intoxicaciones por avermectinas en los carnívoros domésticos.

Teniendo en cuenta el número de casos de intoxicaciones por avermectinas registrados anualmente en el CPVL, el análisis ulterior de los casos de empleo de las emulsiones lipídicas debería permitir una mejor evaluación de la eficacia de este tratamiento así como una puesta en evidencia de las condiciones óptimas para su utilización.

Bibliografía

1. Vidal (2011) Le Dictionnaire, 87ème édition, Editions du Vidal, Issy-Les-Moulineaux, 2595 p.
2. Turner-Lawrence DE, Kerns W (2008) Intravenous fat emulsion: a potential novel antidote. *J Med Toxicol* 4: 109-114.
3. Hantson P (2009) Les émulsions lipidiques: un nouvel antidote? Un traitement expérimental? *Infotox* 32: 1-2.
4. Goor Y, Goor O, Cabili S (2002). A lipid emulsion reduces mortality from clomipramine overdose in rats. *Vet Hum Toxicol* 44: 30-.
5. Harvey M, Cave G, Lahner D, Desmet J, Prince G, Hopgood G (2011) Insulin versus lipid emulsion in a rabbit model of severe propranolol toxicity: a pilot study. *Crit Care Res Pract* article ID 361737, 7 p.
6. Estebe JP (2008) Intralipide et intoxication aux anesthésiques locaux. En: Agora (ed.). Journées Rennaises d'Anesthésie Réanimation, Rennes. 43-47.
7. Mazoit JX, Beloeil H (2008) Toxicité des anesthésiques locaux: quoi de neuf? En: MAPAR (ed.). Communications scientifiques, CHU Bicêtre, Paris. 63-69.
8. Niiya T, Litonius E, Petäjä L, Neuvonen PJ, Rosenberg PH (2010) Intravenous lipid emulsion sequesters amiodarone in plasma and eliminates its hypotensive action in pigs. *Ann Emerg Med* 56: 402-408.
9. Brull SJ (2008) Lipide emulsion for the treatment of local anesthetic toxicity: patient safety implications. *Anesth Analg* 106: 1337-1339.
10. Fernandez AL, Lee JA, Rahilly L, Hovda L, Brutlag AG (2011) The use of intravenous lipid emulsion as an antidote in veterinary toxicology. *J Vet Emerg Crit Care* 21: 309-320.
11. O'Brien TQ, Clark-Price SC, Evans EE, Di Fazio R, McMichael MA (2010) Infusion of a lipid emulsion to treat lidocaine intoxication in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 237: 1455-1458.
12. Lee AL (2010) Advances in Toxicology: the use of intra-lipid therapy (ILE) & high-dextrose insulin (HDI) therapy. En: ACVIM (eds). Real people, real discoveries, Anaheim (Canada).
13. Pritchard J (2010) Treating ivermectine toxicity in cats. *Vet Rec* 166: 766.
14. Crandell DE, Weinberg GL (2009) Moxidectine toxicosis in a puppy successfully treated with intravenous lipids. *J Vet Emerg Crit Care* 19:181-186.

Contaminantes orgánicos persistentes en plasma de tortugas bobas (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias

Camacho M^{1,3}, Luzardo OP^{1*}, Orós J², Calabuig P³, Zumbado M¹, Pinós J³, Almeida González M¹, Ruiz-Suárez N¹, Rodríguez-Hernández A¹, Sangil-Monroy M¹, Henríquez-Hernández LA¹ y Boada LD¹

¹Unidad de Toxicología. Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Veterinaria/Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Apartado de correos 550, 35080 Las Palmas de Gran Canaria. ²Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontaña s/n, 35416 Arucas. ³Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (CRFS) de Tafira (Gran Canaria)

Recibido 2 de mayo de 2012 / Aceptado 29 de noviembre de 2012

Resumen: En el presente estudio se ha evaluado el grado de contaminación por contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en 193 ejemplares de tortuga boba (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias entre 2007-2011. La cuantificación en plasma de los niveles de pesticidas organoclorados (POCs), bifenilos policlorados (PCBs) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) se realizó mediante GC-MS. Todas las muestras analizadas presentaron niveles cuantificables de alguno de los COPs incluidos en el estudio. El grupo de COPs que presentó mayores niveles fue el de los PAHs (alcanzando la carga total de PAHs 6,45 ng/ml), siendo el fenantreno el hidrocarburo más frecuentemente detectado y a concentraciones más altas, lo que indica el origen petrogénico de estos contaminantes. La contaminación por PCBs alcanzó niveles menores (3,84 ng/ml), predominando el grupo de los hexaclorobifenilos (PCB-153 y PCB-138 principalmente). Los niveles de contaminación por POCs fueron también bajos alcanzando valores de 1,67 ng/ml, siendo el principal metabolito del DDT, *p*, *p'*-DDE el compuesto más frecuentemente detectado (89,6%) y a más altas concentraciones (0,68 ng/ml). Fue evidente una asociación inversa entre el tamaño de las tortugas y la carga de PCBs y PAHs. Asimismo existieron niveles más altos de contaminación por COPs en los años 2009 y 2010. Este trabajo evalúa por vez primera la presencia de PAHs en sangre de tortugas varadas y nuestros resultados parecen indicar que esta metodología y esta especie animal pueden ser muy útiles para monitorizar la presencia de contaminación por derivados del petróleo en el medio acuático.

Palabras clave: Tortuga boba, *Caretta caretta*, Islas Canarias, contaminantes orgánicos persistentes, pesticidas organoclorados, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Abstract: Plasma levels of persistent organic pollutants in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands. This study assessed the degree of contamination by persistent organic pollutants (POPs) present in 193 specimens of loggerhead turtle (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands between 2007-2011. Quantification of plasma levels of organochlorine pesticides (POCs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were performed by GC-MS. All samples tested showed measurable levels of several of the POPs included in the study. PAHs was the group that showed the highest levels (total burden of PAHs = 6.45 ng/ml), being phenanthrene the compound most frequently detected and at higher concentrations, indicating the petrogenic origin of these contaminants. PCBs contamination reached lower levels (3.84 ng/ml), dominating the group of hexachlorobiphenyls (PCB-153 and PCB-138 in particular). The pollution levels were also low in the subgroup of POCs, reaching values of 1.67 ng/ml, and being the main

metabolite of DDT, *p*, *p'*-DDE the compound most frequently detected (89.6%) and at highest concentrations (0.68 ng/ml). There was a clear inverse association between the size of the turtles and the burden of PCBs and PAHs. There were also higher levels of POPs in 2009 and 2010 than in the other years. This study evaluates for the first time the presence of PAHs in stranded turtles blood and our results suggest that this methodology and this animal species can be very useful for monitoring the presence of petroleum derivatives contamination in the aquatic environment.

Keywords: Loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, Canary Islands, persistent organic pollutants, organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons.

Introducción

En la actualidad, las poblaciones de las siete especies de tortugas marinas que existen en el mundo se encuentran amenazadas o en peligro de extinción debido principalmente a causas antropogénicas: la pesca incidental, destrucción de hábitats y explotación directa sobre tortugas o huevos para consumo humano [1]. En este sentido, estudios realizados en las Islas Canarias [2,3], han puesto de manifiesto que casi un 70% de las tortugas varadas en estas islas murieron debido a lesiones asociadas con la actividad humana. Se ha de resaltar que, aunque en diferentes proporciones, cinco especies de tortugas marinas visitan el Archipiélago Canario, de las cuales, la tortuga boba (*Caretta caretta*) es la más abundante. Según los estudios genéticos de Monzón-Argüello y cols. [4], los ejemplares juveniles de tortuga boba presentes en aguas de las Islas Canarias proceden en su mayoría de la población del Sur de Florida (44-78%), procediendo el resto del Noreste de Florida – Carolina del Norte (7-26%), Cabo Verde (6-17%) y México (2-9%).

Entre los contaminantes ambientales más ubicuos y con mayores efectos perjudiciales para el medio ambiente, la fauna y las poblaciones humanas se encuentran los contaminantes orgánicos persistentes (COPs), que se caracterizan por su escasa degradación, capacidad para bioacumularse y por sus conocidos efectos carcinogénicos y como disruptores endocrinos y metabólicos [5,6]. De hecho, a pesar de que el uso y fabricación de la mayoría de los pesticidas organoclorados (POCs) y bifenilos policlorados (PCBs) fue prohibido en los años 1970-80, todavía hoy se siguen detectando en muestras humanas, animales o medioambientales [7,8]. Específicamente, las tortugas marinas, debido a su longevidad, movimientos migratorios y su posición en la cadena alimenticia, han sido sugeridas como buenos bioindicadores de la contaminación de los ecosistemas marinos [9,10]. En este contexto hemos de reseñar que los contaminantes organoclorados (POCs y PCBs) han sido detectados en tejidos de tortugas marinas de todo el mundo [9,11] y

*e-mail: operez/dcc.ulpgc.es

que la contaminación química se postula como un gran factor de riesgo para la conservación de las diferentes especies de tortugas marinas. Es por ello que los estudios de monitorización de los niveles de contaminación de sustancias químicas se encuentran entre las 20 cuestiones prioritarias para la conservación de las tortugas marinas a nivel mundial [12].

Pese a la relevancia de las aguas de Canarias como hábitat de tortugas marinas y la necesidad de evaluar los niveles de contaminación en los ecosistemas marinos para preservar estas especies, los datos de los niveles de contaminación en tortugas de estas islas son muy escasos y estos proceden únicamente, de ejemplares de tortugas marinas varadas muertas [13-15]. Recientes estudios han demostrado la utilidad de la muestra sanguínea como muestra biológica no letal para el monitoreo de contaminantes ambientales en estos reptiles [9,17-19]. Además, se ha demostrado una buena correlación entre los niveles cuantificados en sangre y tejidos para la mayoría de los contaminantes medioambientales, sugiriéndose que las muestras sanguíneas permiten establecer buenas estimaciones del nivel de contaminación por contaminantes en tortugas marinas [9,19].

Con el fin de evaluar con exactitud los niveles de contaminación existentes en tortugas marinas que habitan las aguas canarias, hemos desarrollado el presente trabajo en el que cuantificamos los niveles de COPs en muestras de sangre procedentes de 193 ejemplares de tortugas juveniles (*Caretta caretta*) varadas vivas en las costas de nuestro Archipiélago.

Material y métodos

Toma de datos y muestreo

En el presente estudio se han empleado muestras procedentes de 193 ejemplares de tortugas bobas (*Caretta caretta*) varadas en las costas de Islas Canarias durante los años 2007-2011 (2007, n = 41; 2008, n = 45; 2009, n = 46; 2010, n = 30; 2011, n = 31). Todos los animales muestreados ingresaron previamente en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (CRFS) de Tafira (Gran Canaria). La mayor parte de las tortugas ingresaron por razones de enmallamiento en redes de pesca (n = 130). En al menos ocho de los casos no se pudo determinar la causa de varamiento y en el resto de las tortugas las razones fueron variadas: anzuelo (n = 16), fractura de caparazón (n = 8), petróleo (n = 4), caquexia (n = 11), alteración de la flotabilidad (n = 7), problemas de piel (n = 6), ingestión de plásticos (n = 2) y mordida de tiburón (n = 1).

A todas las tortugas se les tomaron medidas de longitud curva del caparazón (LCC) y del peso. La media y desviación estándar de LCC y peso fue $38,9 \pm 11,88$ cm y $8,62 \pm 8,01$ kg, respectivamente. Todas las tortugas fueron clasificadas como juveniles o sub-adultas ya que la talla fue inferior a la determinada para adultas, según la clasificación de Bjondal y cols., que establece el punto de corte en 64 cms [16].

En este estudio, se tomó una muestra de sangre (6 ml) del seno venoso cervical que se conservó en tubos de heparina de litio, obteniéndose posteriormente plasma mediante centrifugación, que fue inmediatamente separado y congelado a -20°C hasta su uso en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria.

Contaminantes analizados

Un total de 52 COPs fueron analizados en este estudio, incluyendo:

- POCs: *p,p'*-DDT y sus metabolitos (*p,p'*-DDE y *p,p'*-DDD); hexaclorobenceno (HCB); los cuatro isómeros de hexaclorociclohexano (α -, β -, γ -, δ -HCH); ciclodienos (aldrina, endrina, dieldrina y heptacloro epóxido); isómeros -cis y -trans del clordano; endosulfán (isómeros α - y β - y endosulfan-sulfato); y mirex.

- PCBs: incluyendo aquellos considerados marcadores de contaminación ambiental por PCBs (*Markers-PCBs*; M-PCBs; congéneres #28, 52, 101, 118, 138, 153, and 180) y los de efectos similares a las dioxinas (*dioxin-like PCBs*; DL-PCBs congéneres #77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189).

- Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), incluyendo aquellos considerados como prioritarios por la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de EEUU (U. S. EPA): naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno, benzo [a] antraceno, criseno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k] fluoranteno, benzo [a] pireno, indeno [1,2,3,-c,d] pireno, dibenzo [a,h] antraceno y benzo [g,h] perileno.

Preparación de las muestras y análisis cromatográfico

Las alícuotas de plasma fueron sometidas a una extracción en fase sólida y analizadas mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas usando los estándares internos (IS) adecuados. Se hizo la extracción de un mililitro de plasma que fue añadido a una columna de 200 mg (3 ml) Chromabond® C18ec, (Macherey-Nagel, Alemania) acoplada a un sistema de vacío (vacuum manifold, Waters Corporation, USA). La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante: antes de la aplicación de la muestra, las columnas fueron acondicionadas con 3 ml de metanol y 3 ml de agua Milli-Q bajo vacío a un flujo de 1,5 ml/min. A continuación, las muestras pasaron a través de la columna mediante gravedad y tras esto, la columna fue lavada con 3 ml de agua al 5% de metanol. Después la columna fue secada mediante vacío durante 15 minutos. Los analitos de interés fueron recuperados de la columna con 2 eluidos de 2 ml de diclorometano cada uno. El disolvente fue evaporado bajo corriente de nitrógeno y los analitos recuperados se resuspendieron en 200 μl de ciclohexano. Los extractos así obtenidos fueron utilizados para los análisis cromatográficos. Los porcentajes de recuperación de los analitos por este método fueron calculados a partir de muestras de plasma libre de contaminantes, a los que se añadió la mezcla de COPs incluidos en el estudio a 3 concentraciones 40, 10 y 0,25 ng/ml. La recuperación para todos los analitos osciló en el rango 89-107%.

Para los análisis cromatográficos se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Thermo Trace GC Ultra – Thermo Quantum XLS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Como fase estacionaria se utilizó una columna capilar de sílice BPX5 (SGE Inc., USA) de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y un diámetro de partícula de 0,25 μm . Como fase móvil se utilizó Helio (99,999%) a un flujo constante de 1.0 ml/min. Se desarrolló un método probando diferentes rampas de temperatura con el fin de lograr la mejor separación de los analitos. Usamos un programa de temperaturas y condiciones cromatográficas previamente optimizado en nuestro laboratorio para estos analitos [20]. El programa de temperaturas que mejor separación permitió fue el siguiente: Temperatura inicial del horno de 60°C mantenida durante 1 min, aumentando a $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 210°C y entonces, a $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta $320^{\circ}\text{C}/\text{min}$ mantenida durante 5 minutos. El tiempo total del cromatograma fue de 54 min. Tanto el inyector como la línea de transferencia fueron fijados a 270°C y 310°C respectivamente.

Los estándares y las muestras fueron inyectados (1µl) en modo de válvulas cerradas.

Para la detección por espectrometría de masas de los 52 COPs se modificó un método en modo de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) desarrollado previamente en nuestro laboratorio [21]. Los tiempos de retención de cada analito se determinaron cromatografiando por separado el espectro completo (rango m/z 45-650). A partir de este cromatograma se seleccionaron los iones precursores de cada uno de ellos y en experimentos independientes se determinó su patrón de fragmentación (m/z de los fragmentos, energías de colisión y abundancia relativa). Se construyó una recta de calibración externa de 0,05 a 100 ng/ml con todos los compuestos en cada punto de la recta. Como gas de colisión se utilizó argón (99,99%) con una presión de 1,5 mTorr en la celda de colisión. Las condiciones de trabajo del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) fueron las siguientes: la ionización se llevó a cabo con una energía de impacto electrónico de 70 eV en MRM con una corriente de emisión de 50 µA y a una temperatura en la fuente de ionización de 220°C. Para prevenir dañar el filamento, se fijó un retraso de 5 minutos en el encendido del mismo. El voltaje del multiplicador se fijó en 1500 V y el intervalo de reposo entre reacciones se fijó automáticamente mediante el algoritmo SRM del software Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). La precisión de los cuadrupolos 1 y 3 se fijó en m/z 0,7 Da (Q1 y Q3).

El límite de cuantificación (LC) del método fue determinado como la concentración del analito que produjo una señal diez veces superior a la señal ruido de fondo del cromatograma. La cuantificación se basó en el área del pico generado por el analito.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (PASW Statistics v 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Debido a que las variables POCs, PCBs y PAHs no seguían una distribución normal, en los resultados se muestran la mediana y el rango (valores máximo y mínimo) además de la media y la desviación estándar de todas las muestras analizadas. Asimismo se muestra el porcentaje de muestras en que se detectó cada contaminante o grupo de contaminantes. Las diferencias entre la concentración de contaminantes y los diferentes grupos (años y causas de ingreso) fueron analizadas con el test no paramétrico Kruskal-Wallis. La correlación de las concentraciones de contaminantes con variables continuas se analizó mediante el test de correlación de Spearman. Valores de P menores de 0,05 (dos colas) se consideraron como estadísticamente significativos.

Resultados y discusión

Tal y como se expone en las tablas 1, 2 y 3, la práctica totalidad de las muestras analizadas presentaron residuos de PCBs y PAHs, y la mayoría también presentaron residuos de POCs (95%).

Con respecto a los POCs, se ha de reseñar que el 94,8% de las muestras analizadas mostraron niveles de algún tipo de pesticida clorado. En cualquier caso, de los 18 POCs incluidos en el estudio sólo cinco presentaron concentraciones superiores al límite de detección (HCB, HCH-β, p,p' -DDD, p,p' -DDE y dieldrin). De entre ellos el p,p' -DDE fue el más frecuentemente detectado (89,6%) y el que alcanzó los mayores niveles ($0,68 \pm 1,15$ ng/ml). Estos resultados coinciden con lo previamente publicado, ya que otros autores

también han descrito al p,p' -DDE como el pesticida que se encuentra en mayores concentraciones en tortugas marinas, con independencia de la especie y de la zona geográfica estudiada [9,22-25].

Tabla 1. Concentraciones (ng/ml) y porcentajes de detección de pesticidas organoclorados (POCs) en 193 ejemplares de tortuga boba (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias entre 2007-2011

Variable	Media \pm SD	Mediana (rango)	% Detección
HCB	0,35 \pm 0,46	0,18 (0,00-3,51)	68,9
HCH-β	0,01 \pm 0,049	0,00 (0,00-0,32)	13,5
DDE	0,68 \pm 1,15	0,28 (0,00-8,94)	89,6
DDD	0,002 \pm 0,01	0,00 (0,00-0,06)	6,7
Dieldrin	0,65 \pm 1,60	0,00 (0,00-8,14)	23,8
ΣDDTs	0,67 \pm 1,15	0,30 (0,00-8,94)	89,6
ΣPesticidas	1,67 \pm 2,46	0,77 (0,00-15,10)	94,8

Los siguientes pesticidas se encontraron por debajo del límite de detección: p,p' -DDT, α -, γ -, δ -HCH, aldrina, endrina, heptacloro epóxido, clordano (isómeros -cis y -trans), endosulfán (isómeros α - y β), endosulfan-sulfato y mirex.

Tabla 2. Concentraciones (ng/ml) y porcentajes de detección de bifenilos policlorados (PCBs)

Variable	Media \pm SD	Mediana (rango)	% Detección
PCB-28	0,34 \pm 0,29	0,22 (0,00-1,24)	88,6
PCB-52	0,04 \pm 0,05	0,01 (0,00-0,27)	46,6
PCB-77	0,001 \pm 0,005	0,00 (0,00-0,05)	6,7
PCB-81	0,003 \pm 0,011	0,00 (0,00-0,08)	10,9
PCB-101	0,003 \pm 0,014	0,00 (0,00-0,12)	10,9
PCB-105	0,002 \pm 0,01	0,00 (0,00-0,09)	4,1
PCB-114	0,004 \pm 0,03	0,00 (0,00-0,34)	4,7
PCB-118	0,13 \pm 0,27	0,05 (0,00-3,10)	65,8
PCB-123	0,005 \pm 0,02	0,00 (0,00-0,2)	11,9
PCB-126	0,006 \pm 0,02	0,00 (0,00-0,22)	10,9
PCB-138	1,74 \pm 2,43	0,83 (0,00-14,01)	93,8
PCB-153	1,01 \pm 2,04	0,40 (0,00-22,55)	93,8
PCB-156	0,01 \pm 0,04	0,00 (0,00-0,38)	11,9
PCB-157	0,02 \pm 0,04	0,00 (0,00-0,20)	30,6
PCB-167	0,006 \pm 0,02	0,00 (0,00-0,14)	17,6
PCB-169	0,001 \pm 0,006	0,00 (0,00-0,06)	3,6
PCB-180	0,57 \pm 1,12	0,20 (0,00-12,01)	88,6
PCB-189	ND	ND	-
ΣM-PCBs	3,30 \pm 4,64	1,78 (0,05-40,70)	100
ΣDL-PCBs	0,18 \pm 0,32	0,09 (0,00-3,61)	81,9
ΣPCBs	3,84 \pm 5,65	2,03 (0,05-53,23)	100

ND = no detectado

Tabla 3. Concentraciones (ng/ml) y porcentajes de detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

Variable	Media ± SD	Mediana (rango)	% Detección
Naftaleno	1,6 ± 2,00	1,63 (0,00-10,29)	53,9
Acenafteno	0,02 ± 0,11	0,00 (0,00-0,92)	6,7
Fluoreno	0,11 ± 0,32	0,00 (0,00-1,73)	17,1
Antraceno	0,01 ± 0,15	0,00 (0,00- 2,10)	3,1
Fenantreno	3,65 ± 3,57	3,10 (0,00-23,45)	93,3
Fluorantreno	0,03 ± 0,17	0,00 (0,00-1,61)	6,7
Pireno	0,05 ± 0,21	0,00 (0,00-1,52)	16,1
Benzo [a] antraceno	0,004 ± 0,01	0,00 (0,00-0,07)	18,7
Criseno	0,003 ± 0,008	0,00 (0,00-0,05)	10,9
Indeno [1,2,3-c,d] pireno	0,0001 ± 0,0007	0,00 (0,00-0,01)	0,5
Dibenz [a,h] antraceno	0,0007 ± 0,004	0,00 (0,00-0,04)	3,1
ΣPAHs	6,45 ± 4,97	5,5 (0,01-29,46)	99,5

Los siguientes PAHs se encontraron por debajo del límite de detección: acenaftileno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k] fluoranteno, benzo [a] pireno y benzo [g,h] perileno.

En relación a los PCBs, es de destacar que todos los animales incluidos en el estudio mostraron niveles detectables de este grupo de contaminantes. Mientras que el PCB-189 no fue detectado en ninguna de las muestras estudiadas, los congéneres 153 y 138 fueron detectados en más del 90% de las muestras. La frecuencia de detección de los distintos congéneres fue la siguiente (ordenada de mayor a menor): PCB-153 y PCB-138 > PCB-180 y PCB-28 > PCB-118 > PCB-52 > PCB-157 > PCB-167. El resto de congéneres incluidos en el estudio fueron detectados en menos del 15% de las muestras. Por lo tanto, y de la misma manera que estudios anteriores en tejidos de tortuga bobas [14,26,27], las muestras sanguíneas estuvieron claramente dominadas por el grupo de los hexaclorobifenilos (97,9%). Es de recalcar, por la relevancia que tienen los M-PCBs como “marcadores” de contaminación ambiental por PCBs que estos se detectaron en el 100% de las muestras, mientras que los DL-PCBs, aunque fueron detectados en un porcentaje alto de las muestras (81,9%), no estuvieron presentes en todas las muestras analizadas.

Se ha de reseñar que entre todos los COPs analizados, fueron los PAHs los que presentaron mayores concentraciones (6,45 ± 4,97 ng/ml) y que este estudio es el primero en describir datos de contaminación por PAHs en tortugas marinas vivas a partir de muestras de sangre. Las escasas publicaciones que han evaluado los niveles de PAHs en tortugas, lo han hecho a través del análisis de tejidos [28]. De las 193 muestras de tortugas analizadas en el presente estudio, 192 presentaron niveles detectables de PAHs. El fenantreno fue el contaminante más frecuentemente detectado y en concentraciones más altas que el resto de hidrocarburos. Sin embargo, acenaftileno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k] fluoranteno, benzo [a] pireno y benzo [g, h, i] perileno no fueron detectados en ninguna de las muestras. Debido a que el fenantreno es uno de los principales componentes del petróleo y que nuestros resultados confirman que en las tortugas estudiadas predominan los PAHs con tres y dos anillos (94,8 y 53,9%) sobre los PAHs con cuatro y cinco anillos (39,9 y 0%), podemos sugerir el origen petrogénico de estos contaminantes. Aunque el fenantreno es considerado relativamente menos tóxico que el benzo [a] pireno (no detectable en ninguna muestra), se ha de hacer constar los potenciales efectos perjudiciales del mismo (debido a la ubicua distribución de este compuesto en

ambientes acuáticos y a su tendencia a acumularse en los organismos).

Ha de señalarse la existencia de asociaciones negativas entre el tamaño de los animales varados (LCC) y las concentraciones de PCBs. Así, los congéneres 28 ($r = -0,17, p < 0,05$), 118 ($r = -0,18, p < 0,05$), 138 ($r = -0,17, p < 0,05$), 153 ($r = -0,30, p < 0,001$) y 180 ($r = -0,24, p < 0,01$) y, como consecuencia, la carga de PCBs marcadores (Σ M-PCBs; $r = -0,24, p < 0,01$), de dioxin-like-PCBs (Σ DL-PCBs; $r = -0,25, p < 0,01$) y la carga total de PCBs (Σ PCBs; $r = -0,23, p < 0,01$), mostraron una relación inversa con el tamaño del animal. Por lo tanto, las tortugas de pequeño tamaño presentaron mayores niveles de contaminación por PCBs que las grandes. Este llamativo resultado, también previamente observado por otros autores [9,22], es de difícil explicación. Una posibilidad es que estos menores niveles en tortugas grandes sean debidos al efecto diluyente del crecimiento debido al mayor acumulo de estas sustancias en estadios tempranos del desarrollo y a exposiciones menores después en la fase nerítica. Sin embargo, otros estudios han observado una correlación positiva entre la talla y concentraciones de contaminantes clorados [29], sugiriendo que el crecimiento juega un importante papel en la concentración de contaminantes orgánicos persistentes a lo largo de su ciclo de vida. Por tanto, nuestro hallazgo es difícil de explicar y ha de ser investigado en profundidad en futuros trabajos.

Por otra parte, también se observaron asociaciones inversas entre la talla y concentraciones de PAHs: acenafteno ($r = -0,19, p < 0,01$), fenantreno ($r = -0,19, p < 0,01$), benzo [a] antraceno ($r = 0,22, p < 0,01$) y Σ PAHs ($r = -0,17, p < 0,05$). Mientras que otros contaminantes orgánicos sufren procesos de bioacumulación conforme mayor es el nivel en el que se encuentran en la cadena alimenticia (siendo los mamíferos los que presentan mayores niveles), los PAHs pueden ser metabolizados y, por lo tanto, es generalmente asumido que la biomagnificación en organismos acuáticos y en la cadena alimenticia marina es insignificante [30,31].

Un llamativo resultado de este trabajo lo constituye la similar tendencia temporal en los tres grupos de contaminantes estudiados, observándose diferencias significativas entre los años de estudio y los diferentes grupos de contaminantes (KW-test, $p < 0,001$). Así, las muestras de tortugas marinas varadas en los años 2007 y 2011 fueron las que menor concentración de contaminantes mostraron, mientras que los niveles en sangre de Σ POCs, Σ PCBs y Σ PAHs fueron mayores en las tortugas varadas en el 2009 y 2010. Esta tendencia temporal queda claramente puesta de manifiesto en las figuras (1a-c), donde se muestra la mediana de la distribución y su variabilidad (representados con círculos y asteriscos). Hemos omitido un valor muy extremo en la figura 1b (año 2009) coincidente con el valor máximo de la carga total de PCBs (53,23 ng/ml). Aunque existen escasos estudios que hayan analizado la tendencia temporal de POCs y PCBs [27], diferencias temporales entre los niveles de PAHs han sido más profundamente estudiados en ecosistemas marinos después de descargas accidentales de petróleo [32-34]. No obstante, es importante hacer notar que, aunque recientemente no ha habido accidentes petrolíferos en aguas del Archipiélago, existe, debido a la situación geográfica de las islas, un importante tráfico marítimo de buques petroleros lo que podría explicar tanto la variabilidad temporal como los elevados niveles de contaminación por PAHs (fenantreno, especialmente).

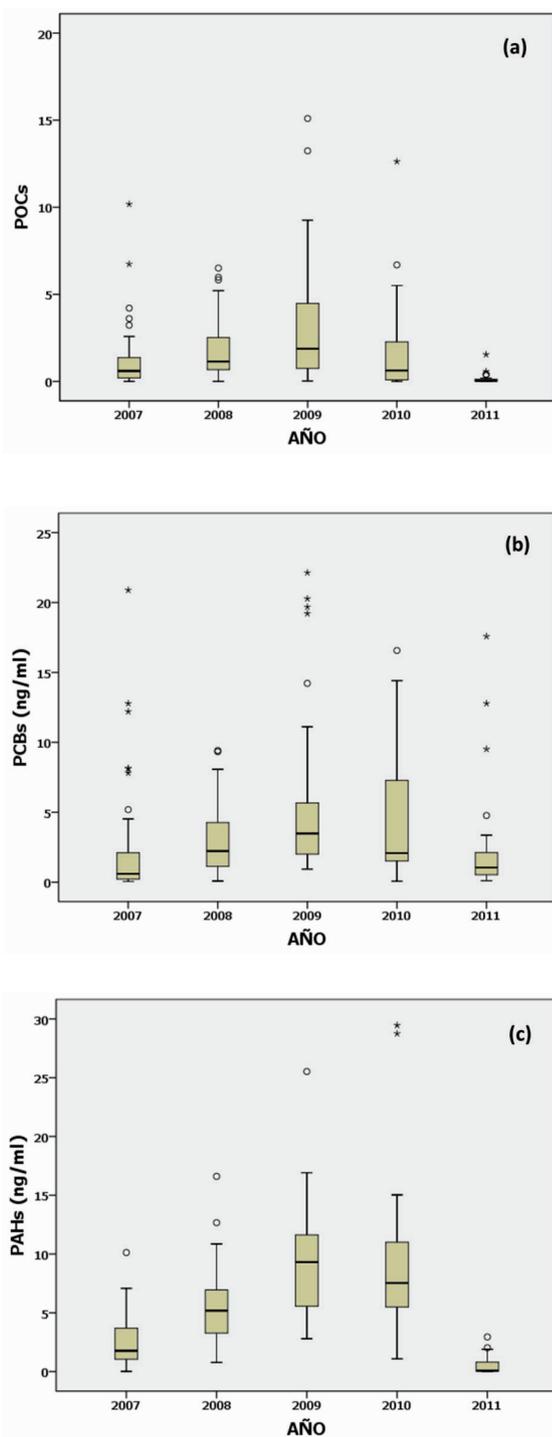


Figura 1. Tendencia temporal de la presencia de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en plasma de 193 ejemplares de tortuga boba (*Caretta caretta*) varadas en las Islas Canarias entre 2007-2011 (a) ΣPOCs; (b) ΣPCBs; (c) ΣPAHs

En cualquier caso, debido al hecho de que los niveles de COPs en sangre pueden sufrir fluctuaciones durante la movilización grasa [9], debiera tenerse cuidado con la interpretación de los resultados obtenidos a partir de muestras sanguíneas y el estudio entre los distintos años y los niveles de contaminación, ya que una pérdida de peso por enfermedad o trauma (como puede ocurrir en tortugas

varadas) lleva a movilización de la grasa y el consecuente incremento de los niveles sanguíneos de contaminantes liposolubles (como es el caso de POCs y PCBs). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas entre los niveles totales de contaminación y las distintas causas de ingreso.

En conclusión, podemos afirmar que este estudio demuestra que la muestra de sangre tomada a tortugas marinas vivas es una muestra adecuada para llevar a cabo estudios de monitorización por COPs (incluyendo PAHs) por lo que puede emplearse en estudios de control de ecosistemas marinos en caso de vertido de petróleo.

Agradecimientos

El presente estudio se ha realizado gracias a la colaboración del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Tafira (Cabildo de Gran Canaria), a todo su equipo y a numerosos estudiantes en prácticas durante el período de muestreo. Esta investigación fue parcialmente financiada por el proyecto PI2007/044, Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información, Gobierno de Canarias. El primer autor realiza su tesis doctoral con una beca de la Consejería de Educación, Cabildo de Gran Canaria (B.O.P. nº 168 de 31-12-08).

Bibliografía

1. Lutcavage EM, Pamle P, Witherington CMF, Lutz PL (1996) Human impacts on sea turtle survival. En: PL L (ed) The Biology of Sea Turtles. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 387-408.
2. Orós J, Torrent A, Calabuig P, Deniz S (2005) Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). *Dis Aquat Org* 63:13-24.
3. Orós J, Arencibia A, Monagas P (2012) Anthropogenic causes of mortality of sea turtles in the Canary Islands: a multidisciplinary approach to the conservation of endangered sea turtles. En: Cosgrove MJ RS (ed) Turtles: anatomy, ecology and conservation. Nova Science Publishers, Nueva York, EE.UU.
4. Monzón-Argüello C, Rico C, Carreras C, Calabuig P, Marco A, López-Jurado LF (2009) Variation in spatial distribution of juvenile loggerhead turtles in the eastern Atlantic and western Mediterranean Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 373:79-86.
5. Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101:378-384.
6. Crain DA, Guillette LJ, Jr. (1998) Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Anim Reprod Sci* 53:77-86.
7. D'Ilio S, Mattei D, Blasi MF, Alimonti A, Bogianni S (2011) The occurrence of chemical elements and POPs in loggerhead turtles (*Caretta caretta*): an overview. *Mar Pollut Bull* 62:1606-1615
8. Peterle TJ (1991) *Wildlife Toxicology*. Van Nostrand Reinhold, New York, EE.UU.
9. Keller JM, Kucklick JR, McClellan-Green PD (2004) Organochlorine contaminants in loggerhead sea turtle blood: extraction techniques and distribution among plasma and red blood cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:254-264.
10. Lazar B, Maslov L, Romanic SH, Gracan R, Krauthacker B,

- Holcer D, Tvrtkovic N (2011) Accumulation of organochlorine contaminants in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*, from the eastern Adriatic Sea. *Chemosphere* 82:121-129.
11. Pugh RS, Becker PR (2001) *Sea Turtle Contaminants: A Review and Annotated Bibliography*. Diane Pub. Co., EE.UU.
 12. Hamann M, Godfrey MH, Seminoff JA, Arthur K, Barata PCR, Bjorndal KA, Bolten AB, Broderick AC, Campbell LM, Carreras C, Casale P, Chaloupka M, Chan SKF, Coyne MS, Crowder LB, Diez CE, Dutton PH, Epperly SP, FitzSimmons NN, Formia A, Girondot M, Hays GC, Cheng IJ, Kaska Y, Lewison R, Mortimer JA, Nichols WJ, Reina RD, Shanker K, Spotila JR, Tomás J, Wallace BP, Work TM, Zbinden J, Godley BJ (2010) Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endang Species Res* 11:245-269.
 13. Monagas P, Oros J, Arana J, Gonzalez-Diaz OM (2008) Organochlorine pesticide levels in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Mar Pollut Bull* 56:1949-1952.
 14. Oros J, Gonzalez-Diaz OM, Monagas P (2009) High levels of polychlorinated biphenyls in tissues of Atlantic turtles stranded in the Canary Islands, Spain. *Chemosphere* 74:473-478.
 15. Torrent A, Gonzalez-Diaz OM, Monagas P, Oros J (2004) Tissue distribution of metals in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) stranded in the Canary Islands, Spain. *Mar Pollut Bull* 49:854-860.
 16. Bjorndal KA, Bolten AB, Martins HR (2000) Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta*: duration of pelagic stage. *Mar Ecol Prog Ser* 202:265-272.
 17. Ley-Quinonez C, Zavala-Norzagaray AA, Espinosa-Carreón TL, Peckham H, Marquez-Herrera C, Campos-Villegas L, Aguirre AA (2011) Baseline heavy metals and metalloid values in blood of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Baja California Sur, Mexico. *Mar Pollut Bull* 62:1979-1983.
 18. Swarthout RF, Keller JM, Peden-Adams M, Landry AM, Fair PA, Kucklick JR (2010) Organohalogen contaminants in blood of Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green sea turtles (*Chelonia mydas*) from the Gulf of Mexico. *Chemosphere* 78:731-741.
 19. van de Merwe JP, Hodge M, Olszowy HA, Whittier JM, Lee SY (2010) Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Mar Pollut Bull* 60:579-588.
 20. Luzardo OP, Mahtani V, Troyano JM, Alvarez de la Rosa M, Padilla-Pérez A, Zumbado M, Almeida M, Burillo-Putze G, Boada C, Boada LD (2009) Determinants of organochlorine levels detectable in the amniotic fluid of women from Tenerife Island (Canary Islands, Spain). *Environ Res* 109:607-613.
 21. Camacho M, Boada LD, Orós J, Calabuig P, Zumbado M, Luzardo OP (2012) Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Mar Pollut Bull* 64:1974-1980.
 22. McKenzie C, Godley BJ, Furness RW, Wells DE (1999) Concentrations and patterns of organochlorine contaminants in marine turtles from Mediterranean and Atlantic waters. *Mar Environ Res* 47:117-135.
 23. Perugini M, Giammarino A, Olivieri V, Guccione S, Lai OR, Amorena M (2006) Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticide levels in tissues of *Caretta caretta* from the Adriatic Sea. *Dis Aquat Org* 71:155-161.
 24. Storelli MM, Barone G, Marcotrigiano GO (2007) Polychlorinated biphenyls and other chlorinated organic contaminants in the tissues of Mediterranean loggerhead turtle *Caretta caretta*. *Sci Total Environ* 373:456-463.
 25. Storelli MM, Marcotrigiano GO (2000) Chlorobiphenyls, HCB, and organochlorine pesticides in some tissues of *Caretta caretta* (Linnaeus) specimens beached along the Adriatic Sea, Italy. *Bull Environ Contam Toxicol* 64:481-488.
 26. Miao XS, Balazs GH, Murakawa SK, Li QX (2001) Congener-specific profile and toxicity assessment of PCBs in green turtles (*Chelonia mydas*) from the Hawaiian Islands. *Sci Total Environ* 281:247-253.
 27. Richardson KL, Lopez Castro M, Gardner SC, Schlenk D (2010) Polychlorinated biphenyls and biotransformation enzymes in three species of sea turtles from the Baja California Peninsula of Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:183-193.
 28. Godley BJ, Gaywood MJ, Law RJ, MacCarthy CJ, McKenzie C, Patterson IAP, Penrose RS, Reid J, Ross HM (1998) Patterns of marine turtle mortality in British waters (1992-1996) with reference to tissue contaminants levels. *J Mar Biol Ass UK* 78:973-984.
 29. Ragland JM, Arendt MD, Kucklick JR, Keller JM (2011) Persistent organic pollutants in blood plasma of satellite-tracked adult male loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Environ Toxicol Chem* 30:1549-1556.
 30. Nakata H, Sakai Y, Miyawaki T, Takemura A (2003) Bioaccumulation and toxic potencies of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in tidal flat and coastal ecosystems of the Ariake Sea, Japan. *Environ Sci Technol* 37:3513-3521.
 31. Perugini M, Visciano P, Manera M, Turno G, Lucisano A, Amorena M (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Gulf of Naples, Tyrrhenian Sea. *J Agric Food Chem* 55:2049-2054.
 32. Marsili L, Caruso A, Fossi MC, Zanardelli M, Politi E, Focardi S (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subcutaneous biopsies of Mediterranean cetaceans. *Chemosphere* 44:147-154.
 33. Pérez C, Velando A, Munilla I, López-Alonso M, Oro D (2008) Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in the marine environment after the Prestige oil spill by means of seabird blood analysis. *Environ Sci Technol* 42:707-713.
 34. Soriano JA, Vinas L, Franco MA, Gonzalez JJ, Ortiz L, Bayona JM, Albaiges J (2006) Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. *Sci Total Environ* 370:80-90.

ACTAS DE LAS JORNADAS DE FORMACIÓN EN TOXICOLOGÍA 2012

Font Pérez G*, Camacho García AT, Cameán Fernández AM, García Fernández AJ, González Muñoz MJ, Lafuente Jiménez MA, Martínez Caballero MA, Repetto Kuhn G, Rodríguez Carrasco Y, Ruiz Leal MJ, Serrano Serrano AB, Soria Sánchez ML y Tolosa Chelos J.

Organizadas por la Asociación Española de Toxicología el 29 de junio de 2012 en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia.

*email: guillermina.Font/uv.es

EDUCACIÓN EN TOXICOLOGÍA

Comunicaciones orales

Moderadores: Rosario Moyano Salvago y María José Ruiz Leal

01) APLICACIÓN DE LAS REDES SOCIALES EN LA METODOLOGÍA DOCENTE.

Prieto, M; Pescador, M; Vicente-Vicente, L; Morales, AI. Unidad de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca.

Las redes sociales, como aplicación informática, han creado un espacio de comunicación único hasta la fecha, ya que permite crear grupos afines que se intercambian de forma selectiva, inmediata, efectiva, confidencial y segura, contenidos diversos que son "compartidos". En este proyecto se pretendió mediante la creación de un grupo específico "alumnos de Toxicología del Grado de Farmacia de la Universidad de Salamanca" utilizar una red social (Facebook) como herramienta con la que alcanzar los siguientes objetivos: 1) Implicar al alumnado en el proceso de elección de contenidos de interés social relacionados con la Toxicología, 2) Introducirlos en una cultura toxicológica que permita el análisis del balance riesgo/beneficio en el uso de medicamentos y la exposición a sustancias químicas y medioambientales, 3) Fomentar la capacidad crítica sobre publicaciones en el área, 4) Estimular la participación de los alumnos mediante una actividad "lúdica" que sirva como refuerzo positivo para el estudio de la asignatura, 5) Familiarizarlos con las nuevas tecnologías, búsqueda bibliográfica en internet, manejo de páginas web... Para ello, se creó el grupo denominado "Toxicología de la USAL". Varios alumnos fueron los administradores de la página y el resto, fueron agregándose al grupo mediante solicitud. A lo largo del curso, participaron el 71 % de los alumnos, se colgaron un total de 190 publicaciones, entre noticias, vídeos, links de interés y artículos científicos, que a su vez fueron comentados. Se hicieron semanas temáticas sobre desastres toxicológicos, en los que se iba aportando información que posteriormente fue recogida en un documento. Para valorar la eficacia de este proyecto se diseñó una encuesta con el fin de conocer la opinión de los alumnos. En la misma, concluyeron que Facebook, en este contexto, les sirvió para alcanzar algunas de las competencias, tanto específicas como transversales, propuestas en los estudios de Grado.

Palabras clave: Facebook, Redes Sociales, Toxicología, Docencia.

02) PARTICIPACIÓN DE LOS ALUMNOS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA EN SU PRIMERA JORNADA CIENTÍFICA.

Jos, A.; Pichardo, S.; Prieto, A.I.; Cameán, AM. Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

La asignatura "Seguridad Alimentaria" pertenece al 2º curso del

Grado en Farmacia, y como tal, no está basada en la mera adquisición de conocimientos teóricos por parte de los alumnos, sino que busca una formación en competencias, lo que exige la incorporación de nuevos modelos docentes. Para ello, se promovió una actividad grupal consistente en la elaboración por parte de los alumnos de pósters científicos basados en temas de actualidad en Seguridad Alimentaria (metilmercurio en pescado, bisfenol A en biberones, melamina en leche, etc.). La bibliografía necesaria para la realización del trabajo fue proporcionada por los profesores de la asignatura y se basó en informes de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Los alumnos interesados presentaron el trabajo realizado en las II Jornadas de Seguridad Alimentaria, organizadas por la Sección de Toxicología Alimentaria de la AETOX en la Facultad de Farmacia, bien como comunicación oral o escrita. Con el fin de fortalecer sus habilidades de expresión en público y el diseño de pósters científicos los alumnos recibieron sesiones formativas por parte de profesionales de la comunicación y el diseño gráfico, gracias a un proyecto de mejora de habilidades extracurriculares concedido por el Plan Propio de Docencia de la Universidad de Sevilla. Además, los trabajos realizados fueron previamente corregidos por los profesores y expuestos en clase. Todo esto permitió que los alumnos afrontaran la participación en su primera Jornada Científica con mayor seguridad. Los resultados de la experiencia fueron muy positivos tal y como se deduce de una encuesta de opinión realizada.

Agradecimientos: I Plan Propio de Docencia. Universidad de Sevilla.

Palabras clave: Jornada científica, Seguridad Alimentaria, Competencias, Habilidades.

03) DOCENCIA PRÁCTICA EN TOXICOLOGÍA VEGETAL VETERINARIA: USO DE LAS TICs Y TRABAJO DE CAMPO.

Soler Rodríguez, F.; Míguez Santiyán, M.P.; Pérez-López, M. Área de Toxicología, Departamento de Sanidad animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad s/n, 10003-Cáceres. E-mail: solertox/unex.es

El diagnóstico de una intoxicación vegetal se basa en la identificación de las posibles plantas tóxicas, el conocimiento de su toxicidad y el establecimiento de relaciones entre la información anterior y el caso clínico que nos ocupa. Una forma de agrupar esos tres aspectos en la docencia de la toxicología veterinaria es el planteamiento de actividades prácticas a los alumnos mediante el uso de las TICs y el trabajo de campo. Se presenta la actividad práctica llevada a cabo en la Facultad de Veterinaria de Cáceres con los alumnos de Toxicología clínica. La sesión comienza en el aula de informática donde a los alumnos se les instruye en aquellas páginas web importantes para la identificación de las plantas en España (Programa Anthos del Real Jardín Botánico de Madrid, web del área de Botánica de la UEx y web del Herbario Virtual del Mediterráneo occidental) y en portales de información sobre toxicología vegetal (Canadian Poisonous Plants Information System y PLANTOX, y otros). A continuación al alumno se le expone un caso práctico propio u obtenido de la bibliografía, teniendo como datos básicos el nombre común de las plantas existentes en el prado (se les exponen 4 fotografías) y el cuadro clínico principal. El profesor toma el papel de ganadero y el alumno el del veterinario que estudia el caso. El alumno/veterinario debe intentar identificar el nombre botánico de las plantas y obtener datos científicos de su toxicidad, que debe contrastar con los del caso clínico, para lo que preguntará al profesor/ganadero todo lo que crea conveniente. Esta actividad se completa con una actividad de campo

en la cual el alumno, pudiendo trabajar en pequeños grupos, debe entregar un herbario con 15 plantas tóxicas en formato tradicional (planta desecada) o digital (fotografías originales de plantas, en las que aparezca el alumno).

Palabras clave: plantas tóxicas, veterinaria, docencia

04) DESARROLLO DE CASOS CLÍNICOS TRANSVERSALES: EXPERIENCIA DINAMIZADORA DE LA UNIDAD DOCENTE DE TOXICOLOGÍA.

Rodamilans, M.¹; Gómez-Catalán, J.¹; Piqué, E.¹; Llobet, J.M.¹; Gual, A.²; Giménez, R.¹; Cambras, T.¹; Alegret, M.¹; Campanera, J.M.¹. ¹Grupo de Trabajo Colaborativo Casos Clínicos Transversales de la Facultad de Farmacia (CCT-FARMA).

²Unidad de Alcoholología de la Generalitat de Catalunya. Institut de Psiquiatria. Hospital Clínic de Barcelona. miguelrodamilans/ub.edu

Hemos puesto en marcha un proyecto de innovación docente basado en el desarrollo de casos clínicos transversales a lo largo de las diferentes asignaturas del grado. La Unidad de Toxicología ha sido uno de los promotores y dinamizadores de este proyecto. La prevalencia del consumo de alcohol en Europa, así como la múltiple patología relacionada con éste, lo convierten en un problema de primera línea en salud pública y por ello el Grupo Colaborativo Casos Clínicos Transversales en Farmacia, ha escogido este tema para iniciar este proyecto transversal. Para desarrollar el caso, se ha introducido un personaje, Sam, un paciente de 20 años, que se inició muy joven en el consumo de alcohol y del que veremos su evolución clínica en las distintas asignaturas del Grado de Farmacia. Sobre el guión básico del caso, los diferentes profesores participantes, en consenso con el resto del grupo, han propuesto una serie de contenidos específicos a tratar en cada una de las asignaturas. El proyecto se inició en febrero de 2012, mediante una presentación ante los alumnos de: los objetivos, la elección del caso, la cumplimentación de un cuestionario voluntario y anónimo sobre consumo de alcohol, la proyección de un documental, así como la distribución de un díptico informativo sobre este proyecto, y un posterior seminario dentro de la asignatura de Bioquímica. Este proyecto propone desarrollar un “estilo” de comunicación entre profesores y un nuevo modelo de enseñanza. De hecho, se pretende favorecer el aprendizaje de los alumnos, pero también generar estrategias de coordinación del profesorado y de elaboración de materiales de uso común. Creemos que esta forma de trabajo en grupo colaborativo es una excelente herramienta para la formación del profesorado y para la coordinación de los contenidos docentes de las asignaturas participantes.

Palabras clave: casos clínicos, coordinación del profesorado, desarrollo de competencias, proyectos interdisciplinarios, transversalidad.

Comunicaciones tipo Cartel

C1) LA DOCENCIA DEL ÁREA DE TOXICOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA. *Gutiérrez, A.J.; Rubio, C.; Luis, G.; Hernández, C.; González-Weller, D.; Caballero, J.M.; Hardisson, A.* Área de Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna, Campus de Ciencias de la Salud, 38071. Tenerife.

La docencia de Toxicología en la Universidad de La Laguna (ULL) se integra en diversas licenciaturas y grados tales como Farmacia, CTA, Medicina, Náutica y Transporte Marítimo y el Máster Oficial de Seguridad y Calidad de los Alimentos. En la Licenciatura de

Farmacia en la ULL (vigente hasta el curso académico 2013/2014), el Área de Toxicología imparte la asignatura troncal *Toxicología* de 7 créditos y 2 asignaturas optativas (*Drogodependencias* y *Toxicología Clínica y Laboral*) de 4,5 créditos cada una. En el nuevo Plan de Estudios de Grado en Farmacia, implantado desde el curso 2010/2011, la asignatura *Toxicología* constituye una materia obligatoria de 9 ECTS. La asignatura optativa *Drogodependencias* se mantiene en el Grado en Farmacia creciendo hasta los 6 ECTS. En el grado de Medicina, la docencia de Toxicología se integra en las asignaturas *Farmacología, anestesia y tratamiento del dolor* (9 ECTS) y *Aspectos éticos, aspectos legales y aspectos humanísticos de la Medicina. Comunicación asistencial* (6 ECTS) impartiendo 1 ECTS y 0,5 ECTS, respectivamente. Respecto a la docencia de posgrado, la Toxicología se imparte en el Máster Oficial en Seguridad y Calidad de los Alimentos desde dos módulos: “*Aguas de consumo de aguas de consumo humano. Vigilancia y control de calidad*” y “*Evaluación del riesgo toxicológico de los alimentos*” con 6 ECTS cada uno de ellos. Actualmente, el área de Toxicología está trabajando junto con otras áreas de la ULL en el diseño del Grado en Ciencias Ambientales, el Grado de Dietética y Nutrición y el Máster Oficial de Postgrado de Biodiversidad Marina. La implantación de nuevos grados y másteres, adaptados al EEES, ha permitido incrementar el número de profesores titulares y asociados en el área de Toxicología de la ULL.

Palabras claves: Docencia, ECTS, Grado, Universidad de La Laguna (ULL), Toxicología.

C2) “FUNDAMENTOS EN TOXICOLOGIA” NUEVA ASIGNATURA DEL GRADO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS EN LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. *Martínez, M.A.; Ares, I.; Martínez, M.; Romero, A.; Ramos, E.; Castellano, V.; Martínez-Larrañaga, M.R.; Anadón, A.* Departamento de Toxicología y Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

La licenciatura de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTA) (BOE de 20-11-1990) ha derivado al Título de Grado. El Grado CYTA se adecua al Espacio Europeo de Enseñanza Superior, se implanta en la UCM, Facultad de Veterinaria, curso académico 2011-2012, siendo uno de sus objetivos el formar profesionales dentro del ámbito de la seguridad alimentaria con conocimientos y capacidad para evaluar el riesgo higiénico-sanitario y toxicológico de un proceso, alimento, ingrediente, envase... En el Grado CYTA, el Departamento de Toxicología y Farmacología es responsable de impartir una nueva asignatura obligatoria “*Fundamentos en Toxicología*” (6 créditos ECTS). Las competencias específicas abarcan:

- Describir las bases de la etiología general de las intoxicaciones comunes y contrastar los tratamientos generales.
- Clasificar los procesos toxicocinéticos y las principales rutas metabólicas de bioactivación y detoxicación.
- Demostrar conocimientos sobre naturaleza, efecto y mecanismo de acción de los tóxicos, y clasificar los procesos tóxicos por órganos (neurotoxicidad, estrés oxidativo y neurodegeneración, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, toxicidad en sistemas respiratorio y cardiovascular, toxicidad sobre la reproducción, toxicidad dérmica y ocular, toxicidad en sistema inmune).
- Aplicar y evaluar los principales ensayos de toxicidad *in vivo*, ensayos de toxicidad con animales transgénicos, y alternativas *in*

in vitro para establecer los estándares toxicológicos y la seguridad de sustancias químicas.

- Extrapolar la información sobre la toxicidad obtenida en animales de experimentación para los animales domésticos, para el hombre y para el medio ambiente.

- Demostrar los conocimientos necesarios para la evaluación del riesgo de sustancias químicas y demostrar capacidad crítica sobre los importantes retos actuales de la Toxicología.

La evaluación de la adquisición de competencias incluye presencialidad (clases teóricas magistrales), participación en seminarios y actividades online, realización de prácticas de laboratorio y de informática obligatorias y realización de una prueba escrita/oral que evalúe la asimilación de los conocimientos adquiridos.

Palabras claves: Fundamentos en Toxicología; Grado de Ciencia y Tecnología de los Alimentos; Departamento de Toxicología y Farmacología de la UCM.

C3) ACERCA DE UNA EXPERIENCIA CON LA HERRAMIENTA METODOLÓGICA DEL APRENDIZAJE BASADO EN PROBLEMAS. *Míguez, M.P.; Soler, F.; Pérez-López, M. Área de Toxicología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad s/n. 10003-Cáceres. e-mail: prado.miguez@gmail.com*

Las características de la sociedad actual en la que las nuevas tecnologías, la facilidad de acceso a la información, cierta o errónea, y el mercado global, marcan un estilo de vida abierto y en continuo cambio, junto con el conocimiento del perfil del nuevo profesional demandado han llevado al convencimiento de que se ha de fomentar una metodología más centrada en una mayor participación del estudiante en la construcción de su conocimiento. El Aprendizaje Basado en Problemas (ABP) como nueva actividad docente promueve un gran número de estas competencias, por lo que se ha elegido esta herramienta didáctica con el objetivo de implementar el aprendizaje de los alumnos de la asignatura de Toxicología Alimentaria, asignatura optativa de 4º/5º curso de la Licenciatura de Veterinaria de la UEx. Al tratarse de un número reducido de alumnos, próximos a egresar, se considera una buena base para llevar a cabo el inicio de estas nuevas técnicas didácticas que les van a proporcionar una serie de competencias transversales muy útiles para su futuro profesional, dado que el ABP no se plantea como objetivo prioritario la adquisición de conocimientos de la especialidad, sino un desarrollo integral del profesional en formación, pues pretende una capacitación en competencias profesionales. Tanto la temática del trabajo como la organización del tiempo fueron aspectos semidirigidos por el profesor, dejando así a los estudiantes un alto grado de libertad en la elección de su objeto de estudio y en la temporalización de la tarea. El producto final de la actividad fue un informe escrito y una presentación oral. Cada alumno llevó a cabo un registro diario del tiempo que dedicaba a tareas relacionadas con el ABP. Puede concluirse que esta metodología activa ha constituido una herramienta didáctica muy útil para conseguir un alto nivel de motivación y participación del alumnado que ha mostrado un alto grado de satisfacción con esta metodología

Agradecimientos: ayuda financiada por el Vicerrectorado de Calidad y Formación Continua y el Servicio de Orientación y Formación Docente de la Universidad de Extremadura

Palabras clave: innovación docente, nuevas metodologías didácticas,

aprendizaje basado en problemas.

C4) ENSEÑANDO TOXICOLOGÍA VETERINARIA EN EL EEEES: RESOLVIENDO CASOS CLÍNICOS EN GRUPOS REDUCIDOS. *Pérez-López, M., Míguez Santiyán, M.P., Soler Rodríguez, F. Área de Toxicología. Facultad de Veterinaria de Cáceres. Avda. de la Universidad s/n. 10071 Cáceres. E-mail: marcospl/unex.es*

El nuevo marco de educación superior en que se sitúan los estudios de Grado impone un refuerzo de las actividades de autoaprendizaje del alumno y el desarrollo de metodologías próximas a la realidad del futuro profesional. Dentro del ámbito de la Toxicología Veterinaria, la necesidad de potenciar las habilidades clínicas adquiere una enorme importancia, pues esta asignatura se sitúa en un contexto curricular idóneo, al abrir el camino a otras especialidades. Mediante la actividad ahora presentada, basada en la resolución de casos clínicos, los docentes modifican su forma de enseñanza, al actuar como facilitadores y asesores, incrementando la motivación y la iniciativa del estudiante. Los alumnos, conformados en pequeños grupos (nunca superiores a 5 personas), interactúan con los docentes, quienes les ofrecen retroalimentación en cada uno de los casos clínicos a analizar. Se busca una actitud activa en la resolución del caso planteado, identificando las necesidades de aprendizaje, para que el alumno investigue, aprenda, aplique y resuelva las dudas. Este nuevo entorno de actividad se centra en el marco de las tutorías ECTS, más personalizadas en el alumno que la tradicional actividad docente. Para el desarrollo de esta actividad se suministran al alumno, al inicio de las tutorías, los datos referidos a 2-4 intoxicaciones animales, para que sean introducidos en una base de datos "toxicológica", y se llegue a determinar el tóxico implicado. Más allá de la mera calificación final, se desea que en el recorrido formativo los alumnos trabajen de manera colaborativa en grupos, practicando y desarrollando habilidades, observando y reflexionando sobre actitudes y valores que en el método convencional expositivo difícilmente podrían haber considerado.

Palabras clave: tutoría, grupo reducido, veterinaria, docencia

C5) EL SERVICIO DE TOXICOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA COMO HERRAMIENTA DE APOYO A LA DOCENCIA. *Martínez-López, E., María-Mojica, P.M., Jiménez, P., Romero D., Peñalver J., González-Franco, J.A., García-Fernández, A.J. Área de Toxicología. Facultad de Veterinaria. Campus de Espinardo, 30100. Universidad de Murcia.*

El Servicio de Toxicología de la Universidad de Murcia (SERTOXMUR) es creado oficialmente a finales de 1996. Su principal objetivo es el de ofrecer a la sociedad en general, y más en particular a los veterinarios, a la administración (principalmente la de Justicia) y a particulares que lo precisen, un servicio de asesoramiento, análisis, diagnóstico e investigación toxicológica. Los veterinarios, tanto clínicos como de granja, precisan estar familiarizados con los agentes tóxicos más asiduamente usados en la zona, para actuar con diligencia en el diagnóstico y tratamiento específicos; sin embargo, los datos epidemiológicos sobre envenenamientos en España son escasos. Dentro de la formación académica veterinaria, con el estudio de la Toxicología se pretende que el alumno complete su formación en los diversos aspectos de la profesión; así en la clínica mediante el diagnóstico y tratamiento de la intoxicaciones, tanto agudas como crónicas; o de manejo y

producción, mediante el conocimiento del riesgo del consumo de piensos y alimentos por los animales. La participación de los alumnos en los Servicios de Toxicología adscritos a instituciones universitarias puede ofrecer el desarrollo de unas competencias profesionales más acordes con las necesidades futuras de los egresados. En ese sentido, en la Universidad de Murcia el alumno de "Toxicología" y de "Ampliación de Toxicología Clínica y Forense" de la titulación de Veterinaria, participa de la labor asistencial de SERTOXMUR en la resolución de casos clínicos y forenses, alimentarios y ambientales, adquiriendo distintas habilidades entre las que destaca el envío y recepción de muestras para investigación toxicológica, el manejo de técnicas y metodologías de muestreo, extracción, aislamiento e identificación de sustancias químicas involucradas en procesos tóxicos y en la interpretación de resultados analíticos en función del destino del resultado (clínico, forense, alimentario, ambiental, pericial).

Palabras Clave: Servicio de toxicología, docencia, veterinaria.

C6) TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN Y LA COMUNICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE RIESGOS TOXICOLÓGICOS. Font, G.; Berrada, H.; Ferrer, E. Laboratorio de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, Valencia, España. Emilia.Ferrer@uv.es

La valoración del riesgo toxicológico por exposición a contaminantes químicos requiere evaluar su exposición y la posterior comparación con los valores límites ambientales y biológicos. En este contexto tienen un papel esencial las Tecnologías de la Información y de la Comunicación (TIC) que favorecen la consecución de los objetivos propuestos con un grado óptimo de calidad. Además, permiten generar espacios virtuales compartidos de relación, formación, investigación y trabajo para el diseño de casos prácticos mediante tareas y guías para el estudiante. El objetivo de este trabajo es la aplicación de las TIC a la evaluación higiénica de la exposición a disolventes y la estimación del riesgo, en la realización de prácticas de la asignatura de Evaluación de Riesgos Toxicológicos. Para ello, se introduce al estudiante en la búsqueda, a través de Internet, en bases de datos especializadas para que encuentre datos sobre la toxicidad del disolvente, legislación y valores límite de exposición, con el fin de definir si las condiciones de trabajo son seguras o no. A partir de los valores límite ambientales (VLA) encontrados, los estudiantes deben determinar el nivel de riesgo al que se encuentran sometidos los trabajadores e indicar si deben sugerirse acciones preventivas y/o correctivas para el puesto de trabajo. Así mismo, los estudiantes deben encontrar los valores límites biológicos (VLB) y relacionar los resultados obtenidos de la exposición ambiental con la exposición en el medio biológico. Posteriormente, se evaluará experimentalmente la exposición en medios biológicos (sangre y/o orina) de trabajadores expuestos y se comparará con los VLB mediante los indicadores establecidos (por ej., ácidos hipúrico y metilhipúrico en orina para el xileno). Cada estudiante informa de los resultados obtenidos y se inicia un periodo de discusión e interpretación de los mismos. Como conclusión, el uso de las TICs coordinado y complementado con el trabajo en el laboratorio permite que los estudiantes adquieran las destrezas y procedimientos relevantes de la asignatura, aprendan a utilizar el método científico, trabajen en la resolución de problemas y relacionen las prácticas con la teoría, obteniendo una formación más flexible, coherente y autónoma.

C7) ANÁLISIS DE LA ASIGNATURA INTRODUCCIÓN A LAS CIENCIAS FORENSES EN EL GRADO DE CRIMINOLOGÍA.

Pichardo, S.; Prieto, A.I.; Cameán, A.M. Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González 2, 41012, Sevilla, España.

En el presente curso académico, 2011-12, ha comenzado en la Universidad de Sevilla el Grado en Criminología, donde el Área de Toxicología de esta Universidad ha participado en la docencia de una asignatura de primer curso denominada "Introducción a las Ciencias Forenses: Toxicología y Medicina Legal". Tras este primer año de docencia, los profesores implicados en la impartición de la asignatura nos planteamos realizar un análisis de las debilidades, amenazas, fortalezas y oportunidades (D.A.F.O.) de la experiencia para poder valorar aquellos factores tanto externos como internos que han influido en el desarrollo de la misma. Se pretende reflexionar sobre los puntos débiles y fuertes que debemos tener en cuenta para poder optimizar el proceso de enseñanza-aprendizaje de la asignatura el próximo curso académico. En concreto, los objetivos del presente proyecto son:

- 1) Conocer cuales son las principales amenazas en el aprendizaje y rendimiento académico de nuestros alumnos.
- 2) Analizar las principales debilidades del sistema de enseñanza de nuestra asignatura que pueden afectar al aprendizaje y rendimiento académico de nuestros alumnos y buscar soluciones al respecto.
- 3) Identificar las principales oportunidades que se presentan para nuestros alumnos, para poder incidir sobre ellas.
- 4) Estimular las principales fortalezas existentes en el sistema de aprendizaje utilizado en la asignatura.

En general, los resultados obtenidos del análisis muestran que las principales amenazas y debilidades se deben a la gran variabilidad en la formación preuniversitaria de los alumnos del Grado en Criminología, lo que hace muy difícil poder establecer un nivel medio de los contenidos de la asignatura así como su seguimiento por todos los alumnos. Para poder mejorar el aprendizaje de nuestros alumnos, nos planteamos para el próximo curso académico reorganizar los contenidos teóricos de la asignatura, incidiendo en aquellos que consideramos más importantes para su formación. Por otro lado, destacamos entre las oportunidades y fortalezas el gran entusiasmo y participación mostrada por nuestros alumnos, así como la colaboración de la Directora del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses de Sevilla (INTCF) con un seminario sobre el Informe Pericial, que ha servido de gran estímulo para nuestros alumnos.

Palabras clave: D.A.F.O., docencia, criminología, ciencias forenses.

C8) MASTER EN SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA: NIVELES DE PARTICIPACIÓN DEL ÁREA DE TOXICOLOGÍA.

Jos, A.¹, Moreno, I.¹, Pichardo, S.¹, Prieto, A.I.¹, Puerto, M.¹, Gutiérrez-Praena, D.¹, Guzmán-Guillén, R.¹, Maisanaba, S.¹, Cameán, A.M.¹, García-Parrilla, M.C.² ¹Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. ²Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

El Master en Seguridad Alimentaria de la Universidad de Sevilla, que se imparte desde el curso académico 2009/10 ofrece los conocimientos teóricos y prácticos necesarios para las actuaciones profesionales relacionadas con la Seguridad Alimentaria tanto en la

Administración Pública como en la Empresa Privada, con el reconocimiento de un Título Propio. En el mismo, se muestran los principios generales y las competencias de los diferentes organismos implicados en Seguridad Alimentaria. El Master está organizado para dar a conocer con detalle las etapas de evaluación, gestión y comunicación del riesgo, fundamentales en todo proceso de evaluación de riesgos. Asimismo otro propósito es el manejo de la legislación alimentaria en el ámbito de la Seguridad Alimentaria, diferenciando las disposiciones y los efectos de las medidas a tomar. Además, se ofrece formación necesaria en Nutrición, los métodos de análisis, los requerimientos de los laboratorios y otros temas, incluyendo una visión con perspectivas de futuro. En definitiva, este master se presenta como una oportunidad para ofrecer formación académica e integrar los conocimientos necesarios desde los distintos sectores relacionados con la Seguridad Alimentaria. El Área de Toxicología participa activamente en el mismo a distintos niveles: 1) en la coordinación, 2) en la impartición de contenidos principalmente en temas de evaluación del riesgo, 3) en la tutorización de los alumnos y en su evaluación durante la duración del mismo, un año completo incluyendo fines de semana al tratarse de un master semipresencial (60 ECTS) y 4) en la dirección y evaluación de los trabajos de fin de master. Se detalla en esta comunicación aspectos más específicos de esta participación.

Palabras clave: Seguridad Alimentaria, Formación Postgrado, Master, Título Propio.

C9) AVANCES DE LA RED IBEROAMERICANA DE TOXICOLOGÍA Y SEGURIDAD QUÍMICA PARA LA FORMACIÓN, DESARROLLO E INVESTIGACIÓN DE LA TOXICOLOGÍA. Pillco, A.; Gutiérrez, R.; Font, G.; Herrero, O.; Cavieres, F.; *de la Peña, E.* *Red Iberoamericana de Toxicología y Seguridad Química (mutagenesisambiental/ica.csic.es).*

Se hace una descripción de las actividades de la RITSQ con los objetivos siguientes: Coordinar la participación de los diferentes grupos existentes en universidades y organismos de investigación de Iberoamérica, implicados en estudios relacionados con Toxicología. Fortalecer la colaboración y el intercambio académico entre los programas de Doctorado y Maestría de diferentes países iberoamericanos que tengan como objeto el estudio y la investigación en Toxicología o áreas relacionadas. Favorecer la realización de proyectos de investigación entre docentes e investigadores de Iberoamérica, pasantías estudiantiles y eventos académicos. Fomentar el intercambio científico de profesionales interesados en Toxicología Ambiental, Clínica, Forense, Analítica, Seguridad alimentaria y Métodos Alternativos. Se destaca la labor realizada por la RITSQ en los 7 años desde su inicio en la publicación de información de los eventos, congresos, reuniones, cursos y otras actividades de interés para la Toxicología. Se muestra que desde el inicio de la *Web*, se han recibido 42.660 visitas y desde el marzo del 2011 a junio de 2012 se han producido 23.930 visitas lo que da una media de 1600 visitas al mes. En la actualidad hay registrados en la misma 751 persona. A lo largo de los años de existencia de la RITSQ, hemos celebrado dos Reuniones de la RITSQ, en Montreal, Canadá y Barcelona, España; y se han presentado 37 carteles en Argentina, Bolivia, Brasil, Canadá, Colombia, Chile, Cuba, España, EEUU; Francia, México, Perú, Portugal, Suecia y Uruguay. El registro a la RITSQ es gratuito y cuenta para ello con la información de difunde la página *Web* (<http://ritsq.org>) que tiene el apoyo del Comité Español de IUTOX-AETOX-ICSU.

C10) EL APOORTE DE LOS PROGRAMAS DE QUÍMICA Y FARMACIA A LA ENSEÑANZA DE LA TOXICOLOGÍA EN CHILE. Vera, C.¹; Tapia, A.¹; *de la Peña, E.*²; Cavieres, M.F.¹. ¹*Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Chile. (fernanda.cavieres/uv.cl).* ² *Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Madrid. Red Española de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal, REMA (epena/ica.csic.es).*

La toxicología es una disciplina cuya enseñanza es subvalorada en Chile, lo que se evidencia en la inexistencia de programas de estudios universitarios que entreguen un grado académico o título profesional en la materia. Así, la enseñanza de la toxicología se ha visto relegada a módulos o unidades que se imparten dentro de otras asignaturas, sobre todo en Programas académicos del ámbito bioquímico o clínico. Una notable excepción la constituyen los Programas de Química y Farmacia impartidos a lo largo del país, dado que en ellos, se incluye a la toxicología como asignatura obligatoria de sus mallas curriculares y por tanto, como exigencia para la titulación como Químico Farmacéutico. En este trabajo se presenta una revisión de las características de las asignaturas de toxicología en las distintas universidades que imparten Química y Farmacia en el país. En general, estos programas académicos tienen una duración de entre 10 a 12 semestres, dictándose la toxicología en los semestres 7 a 11, lo cual indica que se requiere que el estudiante tenga un conocimiento basal de las ciencias farmacéuticas para enfrentar esta materia. La toxicología se imparte en asignaturas semestrales con modalidad de docencia directa en aula en horarios de clase que varían entre 1,5 a 4,0 horas por semana en los cuales se entregan las bases biológicas, químicas y moleculares que explican la toxicidad inducida por las sustancias químicas sobre el ser humano. En la Universidad de Valparaíso, además, se incluyen tópicos de evaluación de toxicidad enfatizando la aplicación de los métodos alternativos o las 3erres. En el perfil de egreso de la mayoría de las carreras de Química y Farmacia se explicita que el profesional Químico Farmacéutico tiene los conocimientos y competencias para desarrollarse en cualquiera de los ámbitos de la toxicología, poniéndose el énfasis en los ámbitos clínico, alimentario y ambiental. De esta forma, los Programas de Química y Farmacia brindan una oportunidad única para la enseñanza de la toxicología en Chile.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Comunicaciones orales.

Moderadores: Guillermo Repetto Kuhn y Rafael Balaña Fouce

01) ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR, DISRUPCIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL Y APOPTOSIS DE ENIATINAS INDUCTORAS DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS HEPG2. *Juan-García, A.*; Ruiz, M.J.; Font, G. *Laboratorio de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n, 46100 Valencia, España *ana.juan/uv.es*

Las Eniatinas (ENs) son micotoxinas hexadepsipéptidas cíclicas producidas por hongos del género *Fusarium*. Se encuentran de forma natural como mezclas, siendo las más importantes las ENs A, A1, B y B1. Además de tener actividad antibiótica, las ENs inhiben la enzima acil-CoA colesterol acil transferasa (ACAT). Sin embargo, también tienen actividad genotóxica tanto *in vivo* como *in vitro* por formación de aductos con el ADN. En este estudio se evaluó la alteración de las fases de distribución del ciclo celular, alteración del potencial

membrana mitocondrial y apoptosis en células HepG2 por citometría de flujo para cuatro micotoxinas de *Fusarium*: EN A, EN A1, EN B y EN B1 a las concentraciones de 1,5 y 3 μM durante 24, 48 y 72 horas. Los parámetros estudiados variaron en función de la EN ensayada. Las ENs indujeron una detención del ciclo celular de forma proporcional al tiempo de exposición y las concentraciones estudiadas. La EN B produjo la mayor detección de la fase G1 en las células HepG2, seguida de las ENs B1, A1 y A. Las ENs A1 y B1 detienen el proceso de la fase M mientras que la proporción de células HepG2 en la fase SubG0 aumentó a las 72h para todas las ENs, si bien para la EN B1 se obtuvo el mayor porcentaje. Por otra parte, se observó que la despolarización de la membrana mitocondrial en las células HepG2 tratadas con las ENs, activa la muerte celular por la ruta mitocondrial de. Esta alteración se observa tras 24h de exposición. La disminución del potencial de membrana mitocondrial se acompañó de una disminución de la viabilidad celular. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2010-17024/ALI).

02) NUEVOS AVANCES DE LAS TÉCNICAS BIOFOTÓNICAS PARA EL CRIBADO DE COMPUESTOS MEDIANTE SISTEMAS DE ALTO RENDIMIENTO Y OTROS ASPECTOS DE BIOLOGÍA CELULAR. *Balaña Fouce, R. Dpto. CC Biomédicas (ULE) e Instituto de Biotecnología (INBIOTEC), León (SPAIN).*

La presente comunicación presenta nuevos avances realizados en nuestros laboratorios en el campo de la biofotónica en un modelo de células eucarióticas primitivas; *Leishmania* spp. En primer lugar se han diseñado proteínas quiméricas nucleares con el fin de dilucidar las secuencias aminoácidas responsables de su transporte nucleocitoplasmático. Para ello se han realizado proteínas de fusión con la GFP de una DNA topoisomerasa de tipo I. Esta enzima es un heterodímero cuyas subunidades son susceptibles de ser transportadas independientemente al núcleo por un sistema de transporte activo dependiente de energía. La construcción de quimeras fusionadas a la GFP permitieron identificar una región de apenas 6 aminoácidos responsable de su translocación al núcleo en la subunidad pequeña de la enzima. En un segundo tipo de experimentos hemos creado cepas de *Leishmania* spp. fluorescentes mediante transfección estable con los genes codificantes de las proteínas mCherry (fluorescencia roja), citrina (fluorescencia verde), CFP (fluorescencia azul), IFP1.4 (fluorescencia infrarroja) y luciferasa (luminiscencia) para estandarizar métodos de cribado de fármacos de alto rendimiento (HTS). Estas células transgénicas emiten fluorescencia cuando son viables y dejan de emitirla cuando son destruidas por el sistema inmunitario del hospedador o por un fármaco citotóxico. Estos sistemas HTS permiten realizar curvas dosis respuesta *in vitro* sin necesidad de tinciones vitales y además permiten el seguimiento *in situ* a tiempo real del progreso de la infección sin tener que sacrificar a los animales. Finalmente, y desde un punto de vista de biología celular, las células fluorescente nos han permitido saber de una manera inequívoca que en *Leishmania* se producen procesos de intercambio génico que pueden ser de gran relevancia en su patogenicidad. *Leishmania* spp. transfectadas con los genes codificantes de citrina y mCherry co-infectaron mosquitos del Gen. *Phlebotomus in vivo*. De los intestinos de dichos insectos se obtuvieron cepas híbridas cuando fueron analizadas al microscopio de fluorescencia que expresaban tanto citrina como mCherry. El análisis molecular de las mismas confirmó que no sólo las cepas híbridas habían intercambiado lo genes codificantes de ambos marcadores fluorescentes sino que también contenían los marcadores

de selección correspondientes a los genes responsables de resistencia a antibióticos. Estos resultados son tres ejemplos de la aplicabilidad de esta metodología a sistemas HTS y otros procesos biológicos y moleculares, que permiten la evaluación de forma inmediata e inequívoca la citotoxicidad y la seguridad *in vitro* e *in vivo* de compuestos químicos.

Financiación: CICYT AGL2010-16078/GAN; ISCIII PI09/0448 y RICET; JCyL (Gr238)

03) DEVELOPMENT OF A MULTIPARAMETRIC CELL-BASED PROTOCOL TO SCREEN AND CLASSIFY THE HEPATOTOXICITY POTENTIAL OF DRUGS. *Tolosa, L.; Pinto, S.; Donato, M.T.; Lahoz, A.; Castell, J.V.; O'Connor, J.E.; Gómez-Lechón, M.J. *. Hospital La Fé, Valencia. *gomez_mjo/gva.es*

Hepatotoxicity is a major reason for drug non-approvals and withdrawals. The multiparametric analysis of xenobiotic toxicity at the single cells level using flow cytometry and cellular imaging-based approaches, such as high-content screening (HCS) technology, could play a key role in the detection of toxicity and the classification of compounds based on patterns of cellular injury. This study aimed to develop and validate a practical, reproducible, *in vitro* multiparametric cell-based protocol to assess those drugs that are potentially hepatotoxic to humans and to suggest their mechanisms of action. The assay was applied to HepG2 human cell line exposed to 78 different compounds for 3 and 24 hours at a range of concentrations (1-1000 μM). After treatments, cells were simultaneously loaded with five fluorescent dyes showing optical compatibility and were then analysed with a HCS Station. By using the new technology of HCS cell parameters associated with nuclear morphology, plasma membrane integrity, mitochondrial function, intracellular calcium concentration and oxidative stress, indicative of prelethal cytotoxic effects and representative of different mechanisms of toxicity, were measured at the single cells level, which allows high-throughput screening. This strategy appears to identify early and late events in the hepatotoxic process, and also suggest the mechanism(s) implicated in the toxicity of compounds to thereby classify them according to their degree of injury (no injury, low, moderate and high injury). On the other hand, in a number of adverse drug reactions leading to hepatotoxicity, drug metabolism is thought to be involved by the generation of reactive metabolites. In order to study the toxicity of bioavailable compounds, HepG2 cells were simultaneously transfected with recombinant adenoviruses encoding CYP1A2, CYP2C9 and CYP3A4 to confer them drug-metabolic competence. This cell model showed to be a suitable hepatic model to test hepatotoxicity of bioavailable drugs and constitutes a valuable alternative for hepatotoxicity testing.

Palabras clave: Hepatotoxicity, In vitro, multiparametric model

04) UTILIZACIÓN DE LA LEVADURA DE FUSIÓN SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE COMO MODELO EN LA DOCENCIA DE CIENCIAS EXPERIMENTALES. *Repetto, G. *; Daga, R.R. Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla. *grehkuh/upo.es*

La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* se ha convertido en los últimos años en un excelente modelo para el estudio experimental de multitud de procesos biológicos. Es un organismo de fácil manipulación, no es patógeno, posee un ciclo de vida y un ciclo sexual de corta duración, presenta un gran parentesco con células

animales y su genoma está totalmente secuenciado y accesible. Entre las aplicaciones más interesantes destacan el estudio del control del ciclo celular y la citocinesis, pero también de las rutas de respuesta al estrés oxidativo y la resistencia múltiple a drogas, de gran utilidad en la defensa ante tóxicos y por la reducción de la eficacia de medicamentos. Según la severidad del estrés, se inducen vías específicas de adaptación, como las del factor de transcripción Pap1, o de respuesta global al estrés, como las descritas en células de mamífero, principalmente mediadas por las MAPKs Sty1 y Pmk. El estrés provoca el acúmulo nuclear de factores de transcripción como Pap1 y Atf1, lo que activa la transcripción de genes de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión reductasa, etc). Además, se aumenta la expresión de los genes de resistencia múltiple a drogas, particularmente mediados por transportadores de tipo ABC que expulsan los tóxicos fuera de la célula. Se presenta la utilización de *S. pombe* como modelo experimental *in vitro* en actividades prácticas y desarrollo y en trabajos de fin de grado, aplicando sistemáticas de selección de mutantes, reversión de mutaciones, modificación de transportadores, etc., en la docencia de materias relacionadas con la genética, farmacología y toxicología.

Palabras clave: Docencia, Levadura, *Schizosaccharomyces pombe*, Modelo experimental, *in vitro*.

Comunicaciones tipo Cartel

C1) CITOTOXICIDAD Y BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE BEAUVERICINA Y FUSAPROLIFERINA EN CÉLULAS CACO-2. Prosperini, A.; Meca, G.; Font, G.; Ruiz, M.J. *Laboratori de Toxicologia, Facultat de Farmacia, Universitat de Valencia, Av. Vincent Andres Estelles, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.*

La beauvericina (BEA) es una micotoxina ciclohexadepsipeptídica con propiedades insecticidas y que produce efectos citotóxicos en células de mamífero. La fusaproliferina (FUS) es una micotoxina tóxica para larvas de *Artemisia salina*, células de insecto y es teratogénica para embriones de pollo. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la citotoxicidad de BEA y FUS en células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal HT-29 y Caco-2 y estudiar el transporte y la biodisponibilidad utilizando las células Caco-2 como modelo gastrointestinal *in vitro* de simulación del epitelio humano intestinal. La citotoxicidad se determinó mediante el ensayo del MTT y los experimentos de transporte y biodisponibilidad se llevaron a cabo utilizando placas Transwell específicas para los estudios de biodisponibilidad, compuestas de tres partes, 1) un filtro sobre el cual las células Caco-2 se cultivan hasta la completa diferenciación (21 días), 2) un compartimento apical que simula el lumen intestinal y donde se introducen las micotoxinas de interés y 3) un compartimento basolateral con la función de recoger las micotoxinas absorbidas por las células, simulando el torrente sanguíneo. La identificación y cuantificación de BEA y FUS en el líquido basolateral se llevó a cabo empleando la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). La concentración inhibitoria (IC_{50}) que se evidenció para la BEA en las células Caco-2 expuestas 24 y 48 horas fue de 24,6 y 12,7 μ M, respectivamente; mientras que los valores de IC_{50} en las células HT-29 fueron de 15,0 y 9,7 μ M, respectivamente. FUS resultó ser citotóxica, pero no se observaron valores de IC_{50} en el intervalo de las concentraciones ensayadas. Los porcentajes de biodisponibilidad de BEA variaron de 50,1 a 54,3%, mientras que FUS presentó valores de biodisponibilidad desde 80,2 hasta 83,2%. Los resultados obtenidos demuestran un riesgo potencial de ambas micotoxinas para la salud

humana.

Palabras clave: Beauvericina, fusaproliferina, citotoxicidad, biodisponibilidad *in vitro*, transporte transepitelial, células HT-29, Caco-2.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL 2010-17024/ALI). A. Prosperini agradece la beca "Santiago Grisolia" concedida por la Conselleria de Educación de la Comunidad Valenciana.

C2) APLICACIÓN DEL E-SCREEN PARA EVALUAR DISRUPCIÓN ENDOCRINA INDUCIDA POR MEZCLAS DE CONTAMINANTES AMBIENTALES. Salas, A.; Aldeguer, M.P.; Navas, I.; Martínez-López, E.; García-Fernández, A.J. *Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. *ajgf/um.es*

La presencia de numerosas sustancias químicas sintéticas en el medio ambiente, y sus efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana, está ampliamente reconocida. Uno de los efectos que más preocupan hoy día es la capacidad de muchos de ellos de interferir con el sistema endocrino. La mayoría de estudios se centran en el efecto que tienen estos compuestos de forma individual, sin tener en cuenta el efecto de las interacciones que puedan surgir entre ellos al encontrarse formando distintas mezclas, tal y como sucede en el medio. En este trabajo se aplica la técnica *in vitro* E-Screen para evaluar la capacidad que tienen las mezclas de ciertos "contaminantes emergentes" e insecticidas organoclorados, de alterar la función estrogénica. El E-screen mide dicha capacidad cuantificando indirectamente la proliferación de células MCF-7, que expresan receptores estrogénicos, tras cinco días de exposición *in vitro* a los contaminantes y/o sus mezclas. Para preparar las mezclas nos basamos en las concentraciones de compuestos organoclorados detectadas en sangre de rapaces del sur y sudeste español (aldrín, dieldrín, DDE, DDT, lindano técnico y endosulfán), así como los detectados en efluentes de depuradoras (AINEs, antibióticos, fármacos del SNC y fragancias). Se incluyeron controles negativos, positivos (17- β -estradiol 1 nM) y controles del solvente DMSO. Tras los cinco días de exposición, se evaluó la proliferación celular mediante colorimetría con la técnica de coloración con sulforhodamina B. Los resultados de las mezclas se compararon con los esperados, tras haber estudiado previamente la actividad estrogénica de estos compuestos de manera individual. Las mezclas de organoclorados indujeron un efecto mucho menor que el esperado, oscilando entre 4,5 y 1,7 veces menor, en función de la naturaleza de la mezcla. Las mezclas de contaminantes emergentes, por grupos, resultaron tener un efecto similar al esperado, excepto en el caso de la mezcla tonalide-celestelolide (con la mitad del efecto esperado) y la mezcla de antibióticos (con un efecto 5 veces mayor).

Agradecimientos: Al Proyecto CONSOLIDER del MICIIN (NOVEDAR-CSD00C-07-22204).

Palabras clave: Estrogenicidad, E-Screen, MCF-7, insecticidas organoclorados, contaminantes emergentes.

TOXICOLOGÍA FORENSE

Comunicaciones orales.

Moderadores: María Luisa Soria Sánchez y Ana María Bermejo Barrera

01) RESUMEN DE CASOS ANALIZADOS EN EL LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE DEL INSTITUTO DE CIENCIAS FORENSES DE SANTIAGO DE COMPOSTELA EN EL AÑO 2011. *Tabernero, M.J.; Álvarez, I.; Cabarcos, P.; Baz, J.A.; Fernández, P.; Bermejo, A.M. Instituto de Ciencias Forenses, Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela.*

En el Laboratorio de Toxicología Forense del Instituto de Ciencias Forenses de la Universidad de Santiago se analizan las muestras procedentes de los juzgados de la Comunidad Autónoma de Galicia. Asimismo, el laboratorio es el centro de referencia en la comunidad gallega para el análisis de los casos de muerte por reacción aguda a sustancias psicoactivas (muerte RASUPSI), recogiendo todos los datos de estos casos según el protocolo establecido a nivel nacional, siendo posteriormente enviados al Plan Nacional de Drogas, para su tratamiento y evaluación estadística. En el año 2011 se han analizado en nuestro laboratorio un total de 1511 casos, de los que 548 correspondieron a muestras de sujetos fallecidos y 963 a sujetos detenidos o puestos a disposición judicial. Los 963 casos de sujetos detenidos o puestos a disposición judicial se han clasificado según los motivos de la detención y dentro de éstos se han estudiado los posibles tóxicos implicados. Como causa mayoritaria destacan los sujetos detenidos por robo/hurto y las ejecutorias (aplicación del artículo 87 del código penal). En estos casos las muestras recibidas han sido el cabello, la orina o ambos (832 muestras de cabello y 590 muestras de orina). En cuanto a los 548 sujetos fallecidos, 182 casos corresponden a muertes naturales y 366 a muertes violentas, predominando dentro de estas últimas las accidentales (212) y suicidios (150), siendo los homicidios únicamente 4 casos. La mayoría de las muertes accidentales se deben a accidentes de tráfico, reacción aguda a drogas de abuso o caídas. En los casos de suicidio la ahorcadura es el método predominante (103 casos). Los tóxicos más frecuentemente detectados son el alcohol etílico, drogas de abuso (cocaína y derivados opiáceos), antidepresivos y benzodiazepinas.

02) LOS ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS EN LA PRÁCTICA DIARIA DE UN MÉDICO FORENSE. *Uroz Martínez, V.*, Calvo Lejárraga, E. Instituto de Medicina Legal de Albacete, Cuenca y Guadalajara. Dirección de Albacete. C/ San Agustín, 1. 02001. Albacete. España. *mvictoria.uroz/justicia.es*

Son frecuentes los casos en los que puede estar indicada la realización de análisis toxicológicos en la práctica diaria de un Médico Forense. La clave de la Toxicología Forense es la interpretación de los resultados en el marco del tipo de muestra, el momento de la toma, la ventana de tiempo que implica, el tipo de tóxico y la concentración confirmada, recordando que un dato de concentración de una sustancia aislado puede no proporcionar gran información acerca del grado de afectación que ésta ejerce sobre el individuo. Con respecto a las Autopsias Judiciales, a la llegada de los resultados toxicológicos forenses del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses podemos encontrar la ausencia de tóxicos en las muestras enviadas, el hallazgo de tóxicos que ya sospechábamos, o bien la detección de otros que no se esperaban. La duda más relevante desde el punto de vista forense que se nos ha planteado en varios casos recientes es saber si en el momento de la muerte la sustancia tóxica estaba activa o no, así como si la concentración encontrada de ésta es la suficiente como para explicar la muerte, describiendo también si puede tratarse de un tratamiento médico de base del fallecido. Con respecto al análisis en vivos, abordamos la detección de drogas de abuso y sus

metabolitos en el cabello, dado que plantea numerosas dudas en cuanto a su utilidad para un imputado cuando se trata de un hecho delictivo que acaeció un día concreto o si el delito no está relacionado con la consecución de la droga. Por otra parte, nos planteamos la utilidad del análisis toxicológico en el caso de la suspensión de la pena que se contempla en el artículo 87 del Código Penal, en especial para sujetos que se encuentran en una comunidad terapéutica en régimen cerrado.

Palabras clave: artículo 87 del Código Penal, análisis toxicológico forense, interpretación de resultados, autopsia judicial, cabello

03) IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES ALUCINÓGENOS EN MUESTRAS DE ORIGEN VEGETAL. *García Repetto, R.; Soria, M.L. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla.*

Presentamos la identificación química de los principios activos más característicos en una muestra de hongos incautada por las Fuerzas y Cuerpos de Seguridad del Estado. Al tratarse de la primera vez que se recibe una muestra de estas características en nuestro laboratorio se ha procedido a la adaptación del método existente para muestras biológicas a esta matriz diferente. Para ello la muestra se ha homogeneizado por acción conjunta de trituración/centrifugación en metanol y la determinación se ha llevado a cabo por GC-MS previa derivatización con BSTFA. Se ha identificado la presencia de los alcaloides alucinógenos Psilocina y Psilocibina que junto con las características morfológicas, han permitido clasificar la muestra recibida del género *Psilocibes*. Los estudios químicos se están completando con los estudios genéticos para poder establecer la especie recibida.

TOXICOLOGÍA VETERINARIA

Comunicaciones orales

Moderadores: Antonio Juan García Fernández y Francisco Soler Rodríguez

01) DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS EMERGENTES DE FUSARIUM EN PESCADO DE PISCIFACTORÍA. *Tolosa, J.; Font, G.; Mañes, J.; Ferrer, E. Departamento de Medicina Preventiva y Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, España. josefa.tolosa@uv.es*

Los piensos compuestos son matrices susceptibles del crecimiento de hongos micotoxigénicos, especialmente bajo condiciones favorables de humedad y temperatura. La introducción en su composición de materias primas susceptibles de contaminación por hongos micotoxigénicos, como por ejemplo, los cereales, favorece la presencia de micotoxinas en piensos destinados a la alimentación animal, y concretamente a la alimentación de peces de piscifactoría. Las micotoxinas emergentes incluyen una serie de micotoxinas producidas por el género *Fusarium*. Éstas son Beauvericina (BEA) y Eniáticas (ENs), entre otras. Deben su nombre a que fueron descubiertas con posterioridad a otras micotoxinas del género *Fusarium* y a que en la actualidad se tienen pocos datos sobre su toxicidad (M. Jestoi, 2008). Diferentes estudios indican la presencia de micotoxinas emergentes de *Fusarium* en cereales y trigo (Manhine et al., 2011; Oueslati et al., 2011; Meca et al., 2010), por lo que cabría esperar que éstas aparecieran en los piensos compuestos destinados a los peces de piscifactoría, los cuales presentan un contenido

significante de cereales en su composición. Sin embargo, no existen datos sobre la presencia de dichas micotoxinas en piensos destinados a diferentes especies animales, entre ellas los peces. El objeto del presente estudio es la determinación de cinco micotoxinas emergentes de *Fusarium* (eniáticas A, A1, B y B1 y BEA) en piensos compuestos para peces de piscifactoría, así como la presencia en el tejido de los peces. Para ello, 20 muestras de pienso para peces de piscifactoría y 6 peces de piscifactoría (*Dicentrarchus labrax*) se analizan mediante extracción con ultrasonidos empleando acetonitrilo como disolvente y purificación con columnas C₁₈ y posteriormente se determinan por cromatografía líquida-espectrometría de masas con triple cuadrupolo (LC-MS-MS QqQ). Los resultados muestran que todas las muestras de pienso y de pescado de piscifactoría analizadas presentaron contenidos de las micotoxinas estudiadas, con una concentración máxima de 10 µg/kg (ENB1) y 2.9 µg/kg (ENA1), respectivamente.

Palabras clave: Pescado, piscifactoría, pienso, eniáticas, beauvericina.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL 2010/17024/ALI. J. Tolosa agradece la beca de investigación (UV-BI-12-007) proporcionada de la Universitat de València.

02) SITUACIÓN DE LOS ENVENAMIENTOS DE FAUNA EN ESPAÑA: APORTACIÓN DE LOS LABORATORIOS DE TOXICOLOGÍA VETERINARIA. *García-Fernández, A.J.*; María-Mojica, P.; Jiménez-Montalbán, P.; Martínez-López, E.; Navas, I.; Gómez-Ramírez, P.; Espín, S.; Romero, D.; Peñalver, J.; Aldguer, M.P.; Salas, A.; Ramón, L.; Cabo, P.; González-Franco, J.A. Servicio de Toxicología y Veterinaria Forense, Universidad de Murcia. *ajgf/um.es.*

El uso de cebos envenenados en el medio natural sigue siendo una práctica habitual en todo el territorio nacional, a pesar de las acciones que se han venido desarrollando, en los últimos años, en la lucha contra el veneno. La fauna objeto de la manipulación y uso de los cebos envenenados es tanto silvestre como doméstica, si bien el mayor impacto social y ecológico se da cuando es la fauna silvestre el objeto de la acción letal de estos cebos. A pesar de ello, en cuanto al número de envenenamientos, es la fauna doméstica la más afectada. Los animales domésticos, sobre todo los perros, seguidos de los gatos, son las víctimas más habituales de los cebos; unas veces, por ser ellos mismos el objeto del veneno y, otras veces, por ser víctimas secundarias de cebos colocados para matar animales silvestres. En este sentido, la fauna doméstica se convierte en un centinela ideal de la realidad que afecta a la fauna silvestre protegida. Por otro lado, la lucha contra el veneno ha dado también algunos frutos, entre ellos la instauración de medidas legislativas para reducir la concentración de principio activo en los productos comerciales, o la prohibición de algunos productos y algunas formulaciones y presentaciones muy utilizadas en las últimas décadas para envenenar. En esta larga lucha contra el veneno en el medio natural, una de las herramientas o aspectos más delicados es el relacionado con la manipulación de las muestras, su toma en condiciones adecuadas para su análisis, así como el propio análisis con garantías de poder llegar a juicio. Algunos laboratorios de Toxicología Veterinaria de Universidades, de centros de investigación o de administraciones autonómicas han colaborado en la búsqueda de herramientas analíticas y periciales adaptadas específicamente a los envenenamientos en el medio natural. Esta colaboración ha sido puesta de manifiesto en las diversas reuniones

sobre el veneno y ha supuesto la elaboración de un protocolo o guía en el que la AETOX ha participado activamente. El proyecto Life VenenoNO es, en la actualidad, el camino aceptado por el estado, las administraciones autonómicas, organizaciones no gubernamentales y laboratorios de referencia para luchar conjuntamente contra esta práctica delictiva.

Comunicaciones tipo cartel

C1) INTOXICACIÓN POR CLORPIRIFÓS EN UN LEMUR DEL BAMBÚ (*Haplemur griseus*) DE UN PARQUE ZOOLOGICO. *Gómez-Ramírez, P.¹; Ramón, L.; Martínez-López, E.¹; María-Mojica^{1,2}, P.; Casares-del Arco, M.³; Gerique, C.³; Carbonell, M.D.³; García-Fernández, A.J.^{1,*} ¹Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. *ajgf/um.es. ²Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Santa Faz, Alicante, Generalitat Valenciana. ³Rain Forest Valencia, S.A. BIOPARC Valencia.*

El lémur del bambú (*Haplemur griseus*) es un primate herbívoro de la familia Lemuridae, endémico de Madagascar, donde se considera una especie vulnerable según la IUCN. Se trata de una de las pocas especies de primates que se alimentan principalmente de bambú. En un parque zoológico, un lémur macho de esta especie, de 8 años y 1,07 Kg, se encontró en lo alto de un arbusto, con ataxia y excesiva salivación. A continuación cayó al suelo y murió a los pocos minutos. El animal solía salir tres días por semana a un recinto exterior con abundante vegetación arbustiva y césped, el cual había sido fumigado con Dursban® (clorpirifos al 48%) 15 y 2 días antes del suceso. Tras la necropsia, las muestras de hígado y contenido gástrico (restos de plantas) fueron remitidas al Servicio de Toxicología de la Universidad de Murcia y analizadas siguiendo un método de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE), más frecuentemente llamada "QuEChERS" (del inglés: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). La detección se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas, encontrando residuos de clorpirifos tanto en hígado como en contenido gástrico. El clorpirifos es un insecticida organofosforado ampliamente utilizado para combatir plagas de insectos, parásitos del ganado y microorganismos patógenos en los cultivos agrícolas. En España hay registrados 74 productos comerciales con distintas concentraciones de este principio activo, por lo que se supone un frecuente uso fitosanitario. Como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, la intoxicación por este compuesto provoca síntomas muscarínicos, nicotínicos y de SNC, entre los que se incluyen los descritos en el presente caso. Este hecho, junto con los resultados analíticos, confirma la intoxicación por clorpirifos como causa de muerte. Este es el primer caso descrito de intoxicación aguda por clorpirifos en lémur.

Palabras clave: Clorpirifós, Quechers, Lemur, Dursban.

C2) ADAPTACIÓN DE QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE RODENTICIDAS ANTICOAGULANTES EN PEQUEÑOS VOLUMENES DE MUESTRA. *Gómez-Ramírez, P.¹; Martínez-López, E.¹; María-Mojica, P.^{1,2}; García-Fernández, A.J.^{1,*} ¹Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. *ajgf/um.es. ²Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Santa Faz, Alicante, Generalitat Valenciana.*

El uso de rodenticidas anticoagulantes es el método más frecuentemente utilizado para el control de plagas de roedores. Debido a sus características físico-químicas y particular mecanismo

de acción, la utilización de estos compuestos en zonas rurales puede suponer un riesgo de intoxicación secundaria de sus depredadores. Para evaluar el riesgo a estos compuestos para la fauna silvestre, especialmente en aves rapaces que se alimentan de roedores, se llevan a cabo los programas de biomonitorización. Puesto que estos programas utilizan muestras de obtención no cruenta como la sangre, se ha querido desarrollar un método fácil, económico y rápido que permitiera el análisis de pequeños volúmenes de muestra de sangre. En el presente trabajo se ha puesto a punto una técnica basada en el método de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE), más frecuentemente llamada “QuEChERS” (del inglés: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe), comparando tres variaciones de la misma. La técnica finalmente elegida permite una recuperabilidad entre 72-134% para los siete rodenticidas objeto de estudio (warfarina, cumatetralilo, difenacoum, brodifacoum, bromadiolona, difacinona), la cual es superior a la obtenida por las técnicas anteriormente descritas. También la sensibilidad de la presente técnica es mayor a la obtenida por otras técnicas. Con el fin de comprobar la utilidad de la técnica validada, se analizaron un total de 50 muestras de sangre de búho real (*Bubo bubo*) de vida libre y 5 muestras de hígado obtenidas mediante necropsia de individuos adultos de la misma especie. Mientras que ninguno de los rodenticidas fue detectado en sangre, en el 80% de las muestras de hígado se detectó al menos uno de los compuestos. Esto puede atribuirse a la cinética de estos compuestos, ya que una vez absorbidos persisten pocos días en sangre y pasan rápidamente a hígado, donde pueden permanecer hasta un año.

Palabras clave: Rodenticidas anticoagulantes-sangre-quechers-biomonitorización

TOXICOLOGÍA CLÍNICA

Comunicaciones orales

Moderadores: Ángel Tomás Camacho García y María Anunciación Lafuente Jiménez

01) NECESIDADES EN LA FORMACIÓN DE LOS TOXICÓLOGOS CANDIDATOS A PUESTOS DE TRABAJO EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA ESPAÑOLA. ¹Fabre, N.; ²Gargallo, D.; ¹Vericat, J.A. *Representantes del Grupo “Desarrollo Preclínico en España” – LinkedIn.* ¹Noscira SA, Tres Cantos (Madrid). ²Ferrer Internacional SA (Barcelona).

La complejidad del proceso de Desarrollo Preclínico de Fármacos requiere la interacción de profesionales de diferentes orígenes. Dado que la determinación de la seguridad de productos y candidatos, y la realización de “risk assessments” son críticos en I+D de fármacos, los toxicólogos bien formados son fundamentales en una empresa farmacéutica. Las tipologías de toxicólogos son:

- Industriales: Participan en la selección y desarrollo de productos de interés.
- Reglamentarios: Aseguran la calidad del dossier de registro y la seguridad del medicamento en consumo.
- Clínicos: Interpretan los efectos observados en los estudios clínicos.
- Ambientales: Controlan los aspectos de seguridad para el ambiente, tanto del producto como de metabolitos e intermedios de producción.
- Mecanicistas: Estudian el mecanismo de toxicidad de los productos
- Forenses: Deben establecer las causas de muerte de voluntarios y pacientes.

A diferencia de las grandes multinacionales, en la industria española, estas actividades suelen agruparse en la(s) misma(s) persona(s), requiriéndose un conocimiento multidisciplinar. Dada la duración del proceso de I+D, el toxicólogo debe conocer técnicas de gestión de proyectos (internos y externos) y costes. Los estudios de seguridad requieren conocimiento de muchos modelos animales y de diferentes aproximaciones experimentales. Determinar semejanzas y diferencias con la fisiología humana es la base del “risk assessment”. Debe también incorporar conocimientos horizontales para permitir el análisis de riesgos (farmacocinética, galénica, etc.). El nivel de conocimientos se puede justificar perteneciendo al Registro Europeo de Toxicólogos. Finalmente, el toxicólogo en la industria debe tener el coraje de asumir ser el portador de malas noticias y que la estructura intentará minimizarlas; actitudes negociadoras son pues muy necesarias. Los autores consideran que todos los conceptos indicados son válidos para la industria cosmética, pesticidas, alimentaria, veterinaria, etc. El “GRUPO DESARROLLO PRECLÍNICO EN ESPAÑA” está integrado por profesionales de la industria dedicados al desarrollo y seguridad de productos químicos, pesticidas o fármacos.

Palabras clave: Desarrollo Preclínico, Toxicología experimental, Industria

02) “EXPOSOME”: LA NUEVA TECNOLOGÍA QUE CAMBIARÁ LA MEDICINA LABORAL. *Camacho, T. Laboratorio Lema & Bandin, Vigo.*

Décadas de investigación evidencian que aunque en el origen del cáncer y de la mayoría de las enfermedades crónicas existen tanto causas genéticas como ambientales, son, sin duda, estas últimas las más importantes (80-90%). Sin embargo, a pesar de su enorme importancia, el “ambiente” sigue siendo muy poco conocido. Pero, ¿qué es exactamente el ambiente? Tradicionalmente el término ambiente ha ido asociado a la exposición a contaminantes ambientales externos, bien en el trabajo (hidrocarburos aromáticos policíclicos en el lugar de trabajo por ejemplo) o bien en el ambiente de la comunidad (pesticidas como contaminantes ambientales por ejemplo). Este concepto de ambiente ha sido absolutamente reduccionista dejando fuera otros factores externos e internos. Entre los primeros nos hemos olvidado del stress, la localización geográfica donde reside el paciente, los hábitos del individuo (ingesta de fármacos, tabaco, alcohol y otras drogas), su actividad física y, sobre todo, la dieta. Pero es que, además, en el término ambiente se hacía poco énfasis en las causas internas (especialmente las infecciones e inflamaciones previas a que había estado expuesto el individuo, y especialmente, la flora intestinal propia, generadora de trimetilamina, la cual constituye un factor de riesgo fundamental en la generación de aterosclerosis. Es por eso que uno de los desafíos de la ciencia es tratar el “ambiente” como una entidad única, con un lenguaje común para todos los profesionales procedentes de diversos ámbitos (medicina del trabajo, epidemiólogos, investigadores, etc.). Este lenguaje común puede ser encontrado gracias al concepto de “exposome”. En palabras de C. Wild, “exposome” constituye la totalidad de las exposiciones (internas y externas) que sufre una persona desde el mismo momento de la concepción, durante toda su vida. Exposome (todo lo no genético) es un nuevo concepto unificador de todas las exposiciones a través de las nuevas tecnologías ómicas (transcriptómica, aductómica, metabolómica), lo que nos permite encontrar nuevos biomarcadores de dosis efectiva que evalúan la “exposición ambiental total”. Estas técnicas son

capaces de detectar un perfil proteico que implica una futura evolución a la enfermedad/cáncer en ese paciente, pero con la particularidad de que si retiramos el agente etiológico tóxico, esa “huella o firma” proteica vuelve a la normalidad. Todo esto hace que el concepto de “exposome” vaya a cambiar en los próximos años la práctica de la medicina en general y de forma concreta la de la higiene industrial, pasando de una medicina preventiva y poblacional, a una medicina predictiva e individualizada.

03) ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN ZONAS DE ALTA EXPOSICION A PLAGUICIDAS. *Autores: Montoya, E.¹; Parrón, T.¹; Hernández, A.²; Alarcón, R.¹; Requena, M.³. ¹Departamento de Neurociencias y Ciencias de la Salud. Universidad de Almería. ²Departamento de Medicina Legal. Universidad de Granada. ³Registro provincial de cáncer. Delegación provincial de Salud de Almería.*

La neurotoxicidad es un grave problema para la salud pública debido al incremento de sustancias de uso común en la industria, tales como solventes, pinturas y plaguicidas que provocan alteraciones neurotóxicas, produciendo cambios importantes en la función psicológica y el comportamiento, que se expresan en trastornos funcionales. Carr (2006) relaciona la exposición a plaguicidas con los daños que se producen en áreas del cerebro relacionadas con la epilepsia, enfermedad de Parkinson y Alzheimer. Se realizó un estudio epidemiológico en el que se recogieron, del Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD) hospitalario, los casos de Alzheimer en el periodo de estudio 2000-2007. En el estudio se han seleccionado distintas zonas de la geografía andaluza, en virtud del número de hectáreas dedicadas a la agricultura intensiva. La tasa de prevalencia de Alzheimer por 100.000 habitantes en los distritos de alto nivel de exposición (268,64). Los distritos de baja exposición tienen una tasa de prevalencia (129,08). Tras realizar la regresión logística binaria, los factores de riesgo que influyen en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer son: edad, el sexo y exposición a plaguicida. Para la edad la OR obtenida es de 1.10 (IC 95%: 1.09-1.10); al comparar hombres frente mujeres la OR obtenida es de 0.64 (IC 95%: 0.59-0.70), y al comparar distritos de alta frente baja exposición la OR obtenida es de 1.65 (IC 95%: 1.52-1.80). Obteniéndose en todos los casos diferencias estadísticamente significativas. Conclusiones: A medida que aumenta la edad también aumenta el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer. Siendo significativo que las mujeres que residen en distritos de alta exposición tienen más riesgo de padecer la enfermedad que los hombres residentes en estas mismas zonas.

Palabras clave: exposición, plaguicidas, Alzheimer

04) TRANSFERRINA: UN BIOMARCADOR DE PREDISPOSICIÓN AL FRACASO RENAL AGUDO POR CISPLATINO. *Vicente-Vicente, L.¹; López-Hernández, F.J.^{1,2}; Prieto, M.¹; López-Novoa, J.M.¹; Morales, A.I.¹. ¹Unidad de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca. ²IESCYL. Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Salamanca.*

En la práctica clínica, la terapia farmacológica requiere que fármacos como el cisplatino y la gentamicina sean administrados de forma conjunta, en pacientes sometidos a tratamientos antineoplásicos que desarrollan infecciones. Debido a que ambos fármacos son potencialmente nefrotóxicos, su utilización constituye una situación

de riesgo frente al daño renal. Por ello simulamos un modelo experimental (ratas Wistar macho) en el estudiamos si la administración de cisplatino a dosis subtóxicas, predispone al fracaso renal agudo (FRA) tras un segundo tratamiento con la gentamicina a dosis también subtóxicas. Los grupos fueron: Control (C), cisplatino (P), gentamicina (G) y cisplatino + gentamicina (PG). Se administró una dosis de cisplatino el día 0 en los grupos P y PG. La gentamicina fue administrada durante 6 días comenzando el día 2, en los grupos G y PG. La función renal se monitorizó mediante la determinación del aclaramiento de creatinina (Clcr), marcadores plasmáticos (creatinina y urea) y urinarios (proteinuria, glucosuria y actividad de la enzima N-acetil-beta-D-glucosaminidasa). En el día 2 (antes de administrar gentamicina) se realizó un análisis proteómico urinario y se confirmó mediante Western blot. La administración de un único fármaco (grupos P y G) no produjo ninguna alteración en los parámetros renales. Sin embargo, la administración de gentamicina en el grupo PG produjo una evidente disfunción renal, confirmando la predisposición adquirida por el tratamiento antineoplásico. El estudio de proteómica reveló una mayor excreción urinaria de transferrina en los animales tratados con cisplatino con respecto a los controles, por lo que esta proteína podría ser una herramienta diagnóstica para prevenir la aparición de un FRA en pacientes tratados con cisplatino que requieran co-tratamientos con otros fármacos nefrotóxicos.

Palabras clave: transferrina, predisposición, daño renal agudo, cisplatino, marcadores

05) DIAGNÓSTICO DE LA PREDISPOSICIÓN AL DAÑO RENAL, INDUCIDO POR URANIO, MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE TRANSFERRINA. *Vicente-Vicente, L.¹; López-Hernández, F.J.^{1,2}; Prieto, M.¹; López-Novoa, J.M.¹; Morales, A.I.¹. ¹Unidad de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca. ²IESCYL. Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Salamanca.*

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio con animales de experimentación, demostraron que la exposición crónica a nitrato de uranio (NU), a dosis que aparentemente no producen daño renal, predisponen al fracaso renal agudo (FRA) cuando los animales eran sometidos a un segundo tratamiento con otro nefrotóxico a dosis no tóxicas. A la vista de estos resultados decidimos buscar marcadores capaces de detectar dicha predisposición. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley que se dividieron en dos grupos experimentales (i) animales expuestos a NU en agua de bebida a dosis subtóxicas y (ii) animales control. Tras 21 semanas de estudio a ambos grupos se les administró un régimen subtóxico de gentamicina durante 7 días. A diferentes tiempos se evaluó la función renal mediante la determinación de marcadores plasmáticos (creatinina y urea) y urinarios (proteinuria y actividad de las enzimas N-acetyl-beta-D-glucosaminidasa). También se realizaron estudios de histología renal. En muestras de orina de la semana 21, antes de la administración de gentamicina, se realizó un estudio de proteómica urinaria diferencial que fue reconfirmado mediante la técnica de Western blot. Tras 21 semanas de exposición a uranio no se observó ninguna alteración en la función renal. Sin embargo, la administración de gentamicina indujo un daño renal tanto funcional como morfológico en el grupo expuesto a NU, confirmando la predisposición adquirida por el mismo. El estudio de proteómica reveló una mayor excreción urinaria de transferrina en el grupo expuesto. Dicha proteína podría considerarse como potencial candidato a biomarcador de predisposición al FRA por exposición crónica a uranio. Este biomarcador sería de gran utilidad a la hora de

prevenir la aparición de daño renal en población potencialmente expuesta a uranio que requiere tratamiento con un fármaco nefrotóxico.

Palabras clave: transferrina, predisposición, daño renal agudo, uranio, marcadores

06) ALTERACIONES CONDUCTUALES Y CEREBRALES INDUCIDAS POR EXPOSICIÓN A PLOMO EN EDAD ADULTA. Mansouri, M.T.¹ Naghizadeh, B.,¹ López-Larrubia, P.,² Cauli, O.³ ¹Department of Pharmacology, Physiology Research Center, School of Medicine, Ahwaz Jundishapur Univ. of Med. Sciences (AJUMS), Ahwaz, Iran. ²Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM, Madrid, Spain. ³Department of Nursing, University of Valencia, Valencia, Spain.

En este trabajo hemos investigado si la exposición a acetato de plomo (50 ppm en la bebida) en ratas adultas, produce alteraciones conductuales. Esta exposición induce concentraciones de plomo <10µg/dL, una concentración muy por debajo de las que se asocia a alteraciones neurológicas en trabajadores expuestos a plomo. Para estudiar la vulnerabilidad entre los géneros, hemos realizado los experimentos en paralelo en machos y hembras de rata adulta. Los resultados demuestran que la exposición a plomo a través de la bebida (50 mg/L) durante 30-45 días induce algunas alteraciones conductuales como hiperactividad en un ambiente nuevo y disminución de la memoria espacial en el test del laberinto acuático de Morris. Se observaron estos efectos sólo en las ratas machos. La memoria de reconocimiento de objetos y la coordinación motora no se alteraron tras la exposición a esta dosis de plomo. La resonancia magnética espectroscópica permite medir los niveles de los principales metabolitos cerebrales (glutamato/glutamina, creatina, mioinositol, N-acetilaspártato y colina) *in vivo*. La exposición a plomo no altera el perfil de estos metabolitos en estriado pero sí que aumenta la señal correspondiente el mioinositol en hipocampo de las ratas machos. El aumento de mioinositol en hipocampo sugiere que la exposición a plomo altera el metabolismo glial en esta área cerebral y representa un marcador potencial nuevo de las alteraciones cerebrales inducidas por el plomo.

Palabras clave: plomo, estriado, hipocampo, espectroscopia, comportamiento

Comunicaciones tipo cartel

C1) ESTUDIO ANDALUZ DE PREVALENCIA DE CÁNCER DE PRÓSTATA Y CÁNCER DE TESTÍCULO EN ZONAS DE ALTA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS. Montoya, E.¹; Parrón, T.¹; Hernández, A.²; Alarcón, R.¹; Requena, M.³. ¹Departamento de Neurociencias y Ciencias de la Salud. Universidad de Almería. ²Departamento de Medicina Legal. Universidad de Granada. ³Registro provincial de cáncer. Delegación provincial de Salud de Almería.

Son numerosos los estudios que han encontrado una posible relación entre los cánceres de próstata y testículo y la exposición a plaguicidas. En el "Agricultural Health Study" encontró un exceso de incidencia de cáncer de próstata en aplicadores de plaguicidas (Alavanja et al., 2005). Investigadores encontraron relación entre el plaguicida, clordano y cáncer de testículo (The Collaborative on Health and the Environment (CHE) Toxicant and Disease Database). Se realizó un estudio epidemiológico en el que se recogieron, del Conjunto

Mínimo Básico de Datos (CMBD) hospitalario, los casos de cáncer de próstata y cáncer de testículo en el periodo de estudio 2000-2007. Se seleccionaron distintas zonas de la geografía andaluza, en virtud del número de hectáreas dedicadas a la agricultura intensiva. Se obtuvieron unas tasas de prevalencia, en ambos cánceres mayores en los distritos de alto nivel de exposición (cáncer de próstata: Alta exposición: 301.5; Baja exposición: 235 y cáncer de testículo: Alta exposición: 33.94; Baja exposición: 17.53). Al comparar el cáncer de próstata en zonas de alta frente a baja exposición se obtuvo una OR: 1.28 (IC 95%: 1.18-1.39) y la OR para el cáncer de testículo fue de 1.94 (IC95%: 1.47-2.55). Obteniéndose en ambos casos diferencias estadísticamente significativas. Conclusiones: En los distritos de alta exposición el riesgo de desarrollar cánceres de próstata y testículo es superior respecto a los de baja exposición, presentando el doble de riesgo en el cáncer de testículo.

Palabras clave: exposición, plaguicidas, cáncer, testículo, próstata

C2) LIBERACIÓN DE IONES METÁLICOS Y EFECTOS GENOTÓXICOS EN PACIENTES CON APLICACIONES ORTODÓNICAS. Martín-Cameán, A.¹; Puerto, M.²; Jos, A.²; Calleja, A.³; Iglesias, A.¹; Solano, E.¹; Cameán, A.M.². ¹Departamento de Estomatología. Facultad de Odontología. Universidad de Sevilla. ²Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. ³Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

Actualmente existe un alto porcentaje de población con tratamiento ortodóncico. Las distintas aplicaciones empleadas en ortodoncia pueden liberar iones metálicos tras sufrir procesos de corrosión, erosión o biodegradación con el tiempo, pudiendo, por un lado, afectar a la efectividad de las aplicaciones ortodóncicas y, por otro lado, producir efectos biológicos en los pacientes. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la liberación de iones metálicos (Ti, Cr, Co, Ni, Cu, Zr) en saliva y células de la mucosa yugal de pacientes portadores de aparatología ortodóncica convencional (brackets y arcos metálicos) y detectar posibles efectos genotóxicos, así como establecer una posible interrelación entre ambos efectos. Se utilizaron para ello diez individuos control y diez pacientes con tratamiento ortodóncico. El contenido metálico se determinó mediante Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado (ICP-MS), y la genotoxicidad se determinó mediante el ensayo del Cometa, que permite detectar roturas de las hebras de ADN. Los resultados muestran una liberación variable en función del elemento metálico considerado así como efectos genotóxicos en aquellos pacientes con aparatología ortodóncica.

Palabras clave: Ortodoncia, metales, ICP-MS, Genotoxicidad, Ensayo Cometa.

C3) DETERMINACION DE LA LIBERACION DE IONES METÁLICOS MEDIANTE ICP-MS EN CELULAS DE LA MUCOSA ORAL DE PACIENTES CON APLICACIONES ORTODÓNICAS. Martín-Cameán, A.¹; Puerto, M.²; Jos, A.²; Calleja, A.³; Iglesias, A.¹; Solano, J.E.¹; Cameán, A.M.². ¹Departamento de Estomatología. Facultad de Odontología. Universidad de Sevilla. ²Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. ³Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

La aplicación de las aleaciones metálicas en ortodoncia presenta un patrón único en el envejecimiento y liberación de metales, siendo

diferente a aquellos estudios sobre aplicaciones biomédicas. Los estudios que investigan la liberación iónica asociada a dichas aleaciones pueden pertenecer a tres categorías, ensayos in vitro, de rescate, e in vivo. Entre los ensayos in vivo, la mayoría de ellos investigan la liberación de iones (como Ni, Cr) en saliva de pacientes, pero son muy escasos los existentes sobre células de la mucosa oral, presentando entre sus ventajas el que dichas células estén en contacto directo con la aplicación, y el hecho de que los tejidos orales pueden absorber los iones metálicos liberados por dichas aplicaciones metálicas. Por todo ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la liberación de iones metálicos (Ti, Cr, Co, Ni, Cu, Zr) en células de la mucosa yugal de pacientes portadores de aparatología ortodóncica convencional (brackets y arcos metálicos) previa optimización de un método que permita su determinación mediante Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado (ICP-MS). Se utilizaron para ello diez individuos control y diez pacientes con tratamiento ortodóncico. El método de toma de muestra se realizó mediante raspado de dichas células con minicepillos y posterior tratamiento de digestión de las células siguiendo el método de Natarajan et al., (2011) modificado en nuestro laboratorio. Los resultados muestran una liberación variable en función del elemento metálico considerado, y diferencias entre ambos tipos de pacientes.

Palabras clave: Células bucales, Ortodoncia, liberación metales, ICP-MS.

Referencias: Natarajan M, Padmanabhan S, Chitharanjan A, Narasimhan M. Evaluation of the genotoxicity of fixed appliances on oral mucosal cells and the relationship to nickel and chromium concentrations: An in-vivo study. *Am J. Orthod. Dentofacial Orthop* 2011, 140:383-388.

C4) PRODUCTOS ORTOPROTÉSICOS DE NEOPRENO Y DERMATITIS ALÉRGICA DE CONTACTO. *Gorgues, J.^{a,b}; Ruiz, M.J.^a; Fernández, M.^a; Font, G.^a* "Laboratorio de Toxicología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. Vincent Andres Estelles s/n 46100 Burjassot, Valencia, España. ^bÁrea de Ortopedia del Muy Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Valencia, c/ Alexander Graham Bell n° 4, Parque Tecnológico de Paterna, 46980 Paterna, Valencia, España.

El neopreno (policloropreno) fue sintetizado por primera vez por Dupont en 1930 y es una de las primeras gomas sintéticas. Es muy resistente al oxígeno, al ozono y a los aceites. La síntesis se realiza por procesos de polimerización en emulsión, lo que da lugar a una espuma elástica con celdillas de aire que le confiere propiedades como aislante térmico, elasticidad uniforme y compresión tridimensional. Tiene muchos usos: productos ortoprotésicos, adhesivos, mascarillas de oxígeno, guantes protectores y los trajes y complementos para la práctica del buceo. En su síntesis intervienen el azufre y diversos catalizadores que actúan como acelerantes y antioxidantes: tioureas, carbamatos y mercaptos que son causa frecuente de dermatitis alérgicas de contacto (DAC). Los alérgenos más frecuentes del neopreno, están incluidos en la batería estándar del Grupo Español de Investigación en Dermatitis alérgica de contacto (GEIDAC) (grupo carbamatos, tiuranes, mercaptos, etc.), de esta forma la DAC debida al neopreno es de fácil diagnóstico usando solo esta batería estándar. Sin embargo, no ocurre lo mismo con el grupo de las tioureas: dietiltiourea (DETU), dibutiltiourea (DBTU) y difeniltiourea (DPTU), que pueden causar también DAC y que no son detectadas con la batería estándar y además la DPTU forma metabolitos altamente reactivos por la bioactivación por enzimas

presentes en la piel. Estos metabolitos son capaces de producir sensibilización de la piel y causar también DAC. Para aumentar las posibilidades de diagnosticar la DAC por tioureas, y especialmente por DPTU, deberían prepararse pruebas de parche específicas de detección de estos metabolitos. La mayoría de los casos publicados como reacciones de contacto al neopreno son reacciones alérgicas de tipo IV y han sido referenciados en la literatura dermatológica pero no así en la ortopédica, pese a que su incidencia va en aumento por el mayor uso de ortesis y prótesis que contienen neopreno.

Palabras clave: Neopreno, Dermatitis alérgica de contacto, Productos ortoprotésicos, Tioureas

C5) RESUMEN ANTÍDOTOS Y ANTAGONISTAS. *Plaza, M.; Font, G., Fernández-Franzón, M.* Laboratorio de Toxicología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. Vincent Andres Estelles s/n 46100 Burjassot, Valencia, España.

Un antagonista es un agente químico que actúa a nivel de receptores, de tal forma que su acción contrarresta la actividad fisiopatológica del agonista (tóxico o medicamento), existiendo de esta manera dos tipos: específicos e inespecíficos. Entre los que más se utilizan está el flumazenilo para las intoxicaciones por benzodiazepinas, naloxona para intoxicaciones por opiáceos o la N-acetilcisteína para intoxicaciones por paracetamol. Un antídoto es un componente químico que actúa directamente sobre el fármaco o tóxico en cuestión, ya sea favoreciendo la eliminación, destruyendo la estructura, cambiando la estructura con el fin de que no sea reconocido por su receptor, etc. Uno de los antídotos más utilizados es el carbón activo, que se presenta en forma de polvo constituido por pequeñas esferas que ofrecen una gran superficie de adsorción con cargas eléctricas capaces de retener una gran diversidad de sustancias: compuestos orgánicos, vapores... pero es poco efectivo con ciertas sustancias: ácidos-bases fuertes, sales metálicas, alcoholes, disolventes, cianuros y sustancias de absorción rápida. Se tiene la idea generalizada de que cada tóxico posee un antídoto específico; pero en la práctica no se dispone de un verdadero antídoto o antagonista en más del 2% de las intoxicaciones. También es muy frecuente encontrar en las bibliografías antagonistas y antídotos mezclados, por lo que dificulta aun más su diferenciación y mecanismo por el cual actúan. En la actualidad, el uso de la inmunoterapia con antisueros es el tratamiento de elección en muchas de las intoxicaciones. Algunos de los ejemplos que lo justifican son los anticuerpos anti-digoxina o anti-colchicina, los cuales se unen específicamente a sus respectivos tóxicos formando componentes insolubles que tienden a precipitar evitando su absorción además de favorecer la eliminación de los mismos.

Repetto Jiménez, M. & Repetto Khun, G. (2009) Antídotos y antagonistas En: *Toxicología fundamental* (Díaz de Santos, eds.) Madrid. 338-402.

Capapé Zache, S. & Trebolazabala Quirante, N. (2003) *Manual de intoxicaciones en urgencias. Actuación en urgencias hospitalarias.* (Ergón, eds.) Madrid. 349-359.

TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA

Comunicaciones orales.

Moderadores: Ana María Cameán Fernández y Guillermina Font Pérez

01) MERCURIO Y METILMERCURIO EN PECES

¿SUPERAMOS LA INGESTA TOLERABLE? *Hardisson, A.; Gutiérrez, A.J.; Rubio, C.; Luis, G.; Hernández-Sánchez, C. Área de Toxicología de la Universidad de La Laguna, Facultad de Medicina, Campus de Ofra s/n, 38071. La Laguna, Santa Cruz de Tenerife.*

En este trabajo se presenta un estudio sobre la ingesta total de mercurio en la Comunidad Autónoma Canaria y partiendo de los datos de ingesta obtenidos y de la Ingesta Semanal Provisional Tolerable del mercurio y metilmercurio, se procede a realizar la evaluación del riesgo tóxico. Del estudio realizado se concluye que la ingesta total de este metal en la Comunidad Autónoma Canaria está muy por debajo de la Ingesta Semanal Provisional Tolerable. No obstante conviene destacar que la ingesta de atún rojo, pez espada y tiburón aun teniendo concentraciones inferiores a 1 mg/kg (concentración máxima admisible para estos peces), determinadas ingestas semanales de estos peces pueden superar ampliamente la ISPT. Asimismo, se ha llevado a cabo un estudio en peces de acuicultura: lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*) y trucha (*Oncorhynchus mykiss*) donde se ha demostrado que las concentraciones son muy inferiores a 0,1 mg/kg, indicativo de la baja impregnación de estos peces a los contaminantes mercuriales. Por último, se ha realizado un estudio preliminar en Panga (*Pangasius hypophthalmus*) encontrando en algunas muestras concentraciones próximas y superiores a 0,5 mg/kg (concentración máxima admisible para pescado blanco). Estos datos ponen de manifiesto que la Panga que se consume en España puede proceder de países terceros con altos índices de contaminación y donde la trazabilidad no esta controlada. Esto es especialmente grave para poblaciones de riesgo tales como niños, embarazadas y ancianos.

02) EL PLOMO Y LA CARNE DE CAZA: POLÉMICA ACTUAL PARA UN PROBLEMA MÁS QUE CONOCIDO. *Soler Rodríguez, E. Área de Toxicología, Departamento de Sanidad animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avd. de la Universidad s/n, 10003-Cáceres. E-mail: solertox/unex.es*

En febrero de 2012 el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha aprobado un informe sobre el riesgo asociado a la presencia de plomo en carne de caza silvestre de España. En él se revisan los trabajos publicados en la bibliografía científica sobre el tema constatando que es frecuente la superación de los límites máximos de residuos establecidos por la UE para carnes de abasto. También se indican una serie de recomendaciones específicas para disminuir el riesgo, como son las relativas al consumo y preparación de los alimentos derivados de estas actividades cinegéticas, en particular al grupo de los consumidores habituales de estas carnes, y a las de promover la sustitución o prohibición del plomo en la munición por otras alternativas existentes menos tóxicas. Este informe ha provocado polémica en los medios de comunicación debido a las declaraciones contrarias al informe por parte de cazadores y de comercializadores y productores de carne de caza. Debido a los escasos trabajos realizados en España sobre la carne de caza mayor y sus posibles riesgos para los consumidores, en esta comunicación se presentan los resultados obtenidos en carne de un número muy importante de ciervos (n=219) y jabalíes (n=299) abatidos en Extremadura. El 49,27% de las muestras de ciervo y el 49,68% de las de jabalí superaron en LMR establecido para los animales de abasto. Si bien esto no supone un problema real para los no consumidores habituales de estas carnes, para el grupo de riesgo (particularmente cazadores y sus familiares directos) el consumo exclusivo de carne de ciervo supondría el

38,86% de la ISTP del plomo, y el 55,79% en el caso de la carne de jabalí. Estos resultados corroboran las recomendaciones del informe del Comité Científico de la AESAN.

Palabras clave: plomo, carne, caza, ciervo, jabalí.

03) EFECTOS DE UN PERIODO DE DEPURACIÓN SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO EN PECES DE CONSUMO HUMANO POR UNA EXPOSICIÓN A DOSIS REPETIDAS DE CILINDROSPERMOPSINA. *Ríos, V.; Moreno, L.; Prieto, A.I.; Llana, M.; Cameán, A.M. Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.*

Las fuentes de exposición a Cilindrospermopsina (CYN) son principalmente a través del agua de bebida, por ingestión de aguas durante la práctica de actividades recreativas y por consumo de alimentos contaminados debido a procesos de bioacumulación de CYN a través de la cadena alimentaria. Recientemente se ha demostrado que CYN es capaz de inducir estrés oxidativo en peces expuestos a la toxina, a escala de laboratorio. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si un periodo de depuración, tras una exposición previa de peces a CYN, puede influir o revertir los daños de estrés oxidativo producidos por la cianotoxina, en tilapias (*Oreochromis niloticus*) expuestas a escala de laboratorio. En concreto se evaluó la peroxidación lipídica (LPO) y los niveles de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en hígado de tilapias expuestas a dosis repetidas de CYN mediante inmersión durante 14 días y sometidas a dos periodos de depuración, 3 y 7 días. Para ello, se establecieron ocho grupos (n=8) de tilapias: 4 grupos control y 4 grupos expuestos a 10 µg CYN/L agregando a los acuarios una porción de biomasa de *A. ovalisporum* LEGE X-001. A los 14 días de exposición se sacrificó al primer grupo expuesto tomándolo como referencia del estrés oxidativo inducido por CYN. Para ver la posible reversión de los efectos, el resto de grupos se sacrificó a los 3 y 7 días de depuración. Los resultados obtenidos nos hacen concluir que la situación de estrés oxidativo, observado tras 14 días de exposición a 10 µg CYN/L y manifestados con un aumento de LPO, y un descenso de la actividad de las enzimas SOD y CAT, es revertida tras 7 días de depuración.

Palabras clave: Cilindrospermopsina, tilapias, estrés oxidativo, depuración, reversión

Agradecimientos: Los autores agradecen a CICYT (AGL2009-10026ALI) y a la Junta de Andalucía (P09-AGR-4672) la financiación del presente estudio.

04) INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS EN LA ESTABILIDAD DE LAS MICOTOXINAS EMERGENTES DE FUSARIUM. *Serrano, A.B.; Ferrer, E.; Mañes, J.; Font, G. Laboratori de Toxicologia. Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Universitat de València. Avda. Vicent Andrés Estelles s/n Burjassot- Valencia- Spain.*

Las micotoxinas son contaminantes naturales presentes en los alimentos como consecuencia del metabolismo secundario de diferentes especies de hongos filamentosos. Una dieta con elevados niveles de micotoxinas puede causar riesgo de toxicidad aguda y crónica sobre la salud del consumidor [1]. En las últimas décadas están recibiendo importancia las micotoxinas emergentes de *Fusarium*, especialmente las eniatinas A, A₁, B y B₁ (ENs), las cuales son de gran interés debido a su toxicidad y a su alta incidencia en los alimentos [2]. A pesar de sus efectos tóxicos, todavía no existen

medidas eficaces de prevención para controlar su presencia en los alimentos. Diversos estudios han indicado que las micotoxinas pueden sufrir cambios durante el procesado y la cocción de los alimentos [3]. Actualmente no existen estudios acerca de la estabilidad de las ENs durante los diferentes tratamientos térmicos. En este contexto, el objeto del presente trabajo es el estudio de la estabilidad de las ENs en sistemas modelo acuosos mediante la aplicación de tratamientos térmicos con variaciones de pH. Los resultados obtenidos indican que existe un aumento de la degradación de las micotoxinas estudiadas con el aumento del tiempo de calentamiento a los tres pH estudiados (pH=4, pH=7 y pH=9). Durante 15 min de calentamiento en solución básica se alcanzó el 100% de degradación de las cuatro ENs, mientras que en la solución ácida se degradó el 100% de las ENs A₁, B y B₁, y cuando se empleó pH neutro únicamente se consiguió el 100% de la degradación de las ENs A₁ y B.

Palabras clave: micotoxinas, *Fusarium* spp., tratamientos térmicos, LC-MS/MS.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad la financiación para la realización del presente estudio (AGL2010/17024/ALI). A.B. Serrano agradece la beca FPI (BES-2011-045454) proporcionada por el Ministerio de Economía y Competitividad.

[1] Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). *Clin. Microbiol. Rev.*, 16(3): 497-516. [2] Jestoi M. (2008). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 48: 21-49. [3] Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2007). *Int. J. Food Microbiol.*, 119: 140-146.

Comunicaciones tipo cartel

C1) TOXICIDAD DE EXTRACTOS DE MIGRACIÓN DE ARCILLAS MODIFICADAS EMPLEADAS EN EL ENVASADO DE ALIMENTOS EN LA LÍNEA CELULAR CACO-2. Maisanaba Hernández¹, S.; Gutiérrez Praend¹, D.; Puerto Rodríguez¹, M.; Pichardo Sánchez¹, S.; Jordá Beneyto², M.; Bermúdez Saldaña², J.; Aucejo Romero², S.; Cameán Fernández¹, A.; Jos Gallego¹, A. ¹Área de Toxicología, Dpto. de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla. ²Área de Materiales y Sistemas de Envasado. Línea de Desarrollo de Nuevos Materiales. ITENE. Valencia.

Desde el Siglo XIX los continuos cambios en el embalaje de alimentos han dado lugar a grandes avances encaminados hacia el aumento de la calidad y seguridad alimentaria. La nanotecnología alimentaria es, en parte, responsable de estos avances, entre los cuales destaca la mejora de las propiedades de barrera de materiales plásticos por la incorporación a los mismos de nanoarcillas modificadas. Debido a la presencia de estos nanomateriales en el embalaje de alimentos, éstos pueden llegar al consumidor por vía oral, por la posible migración que sufren desde los plásticos de los envases hacia los alimentos, pudiendo llegar a producir efectos potencialmente tóxicos. En el presente trabajo se han llevado a cabo diversos ensayos *in vitro* de citotoxicidad basal con los extractos de migración obtenidos a partir de un material nanocompuesto con ácido poliláctico y dos nanoarcillas modificadas desarrolladas por ITENE, Clay 1 y Clay2 en la línea celular Caco 2, la cual imita estrechamente al sistema *in vivo*. Las células se expusieron a concentraciones de entre un 2,5% y un 100% de extracto/medio de cultivo, determinándose la captación de rojo neutro (RN), la reducción de la sal de tetrazolio MTS (MTS), y el contenido proteico total (PT) como

biomarcadores de viabilidad celular. Ninguno de los dos extractos produjo una disminución de viabilidad celular excepto en las dos últimas concentraciones ensayadas, las más elevadas, estando las mismas compuestas en su mayoría por extracto (agua). Por tanto, los efectos tóxicos observados parecen ser debidos a la depleción de nutrientes esenciales para la célula y cambios en la osmolaridad, más que a la posible presencia de compuestos tóxicos en el mismo.

Palabras clave: nanotecnología, seguridad alimentaria, nanoarcillas, migración, embalaje.

Agradecimientos: Proyectos de la Junta de Andalucía AGR5969 y del Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2010-21210.

C2) EFECTOS CITOTÓXICOS Y GENOTÓXICOS DE LA ARCILLA CLOISITE® 30B EN LA LÍNEA CELULAR HEPÁTICA HUMANA HEP-G2. Puerto, M.¹; Macías, J.M.¹; Maisanaba, S.¹; Pichardo, S.¹; Jordá, M.²; Bermúdez, J.M.²; Aucejo, S.²; Cameán A.M.¹; Jos, A.¹. ¹Área de Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. ²Área de Materiales y Sistemas de Envasado. Línea de Desarrollo de Nuevos Materiales. ITENE. Valencia.

Las nanoarcillas son filosilicatos naturales, que se emplean en la fabricación de materiales compuestos poliméricos para mejorar sus propiedades, tales como la resistencia térmica y mecánica. Gracias a las ventajosas propiedades que aportan, las nanoarcillas se emplean en un amplio rango de aplicaciones industriales, entre ellas en el desarrollo de materiales de envase para alimentos. Debido a la presencia de estos nanomateriales en el embalaje del alimento, éstos pueden llegar al consumidor por vía oral y potencialmente pueden producir efectos tóxicos. El objetivo del presente estudio ha sido evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad de Cloisite® 30B, una arcilla empleada para mejorar las propiedades de barrera de los plásticos, en la línea celular hepática humana Hep-G2, con vistas a la seguridad del consumidor debido a una posible exposición por vía oral. Tras la exposición a un rango de concentraciones (3,91-500 µg/mL) de Cloisite® 30B durante 24 y 48 horas, se estudiaron los siguientes marcadores de citotoxicidad: captación del colorante rojo neutro (RN), contenido proteico (PT) y metabolización de la sal de tetrazolio MTS (MTS). Además, se realizó el ensayo cometa, ensayo de genotoxicidad que nos permitió detectar roturas dobles de la hebra de ADN. Los resultados obtenidos mostraron efectos citotóxicos dependientes de la concentración y el tiempo de exposición por acción de la arcilla. Los tres biomarcadores ensayados mostraron efectos similares, siendo el más sensible la captación del RN. Con respecto al ensayo de genotoxicidad, es a 88 µg/ml de Cloisite® 30B a las 48h de exposición cuando se aprecia rotura del ADN de forma significativa con respecto al control. Teniendo en cuenta los efectos citotóxicos y genotóxicos observados en la línea hepática humana Hep-G2, no se puede descartar la posibilidad de que se produzcan efectos tóxicos a nivel hepático *in vivo* por exposición a Cloisite® 30B. Por tanto, sería necesario controlar la migración de esta arcilla del envase a los alimentos en vistas a la seguridad del consumidor.

Palabras clave: nanoarcilla, Cloisite® 30B, línea celular, citotoxicidad, genotoxicidad.

Agradecimientos: los autores agradecen a la Junta de Andalucía (AGR5969) y al MICINN (AGL2010-21210) la financiación de este trabajo, y al Servicio de Biología del CITIUS el soporte técnico.

C3) BIOACUMULACIÓN DE LAS CIANOTOXINAS MICROCISTINA LR Y CILINDROSPERMOPSINA EN PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa*). Prieto, A.I.¹, Campos A.², Cameán A.M.¹, Vasconcelos V.M.^{2,3}. ¹Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. ² Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, CIIMAR/CIMAR, Universidade do Porto, Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal. ³ Departamento de Biología, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 4069-007 Porto, Portugal.

La planta de arroz (*Oryza sativa*) es una especie vegetal muy utilizada para el consumo humano que se cultiva en plantaciones inundadas mediante contacto continuo con el agua. El uso de aguas de riego contaminadas con cianotoxinas como son la Microcistina LR (MC-LR) o la Cilindropermopsina (CYN) pueden suponer un riesgo para la salud humana. Por ello, tiene gran interés desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, la valoración de la bioacumulación de MC-LR y CYN en *Oryza sativa*. Con este fin se realizaron dos experimentos: En el primero, se expusieron 3 lotes de plantas de arroz (n=8) a 50 µg MC-LR/L procedente de un extracto de *Microcystis aeruginosa* PCC7820, y en el segundo se expusieron otros 3 lotes de plantas de arroz (n=8) a 2,5 µg CYN/L procedente de un extracto de *Aphanizomenon ovalisporum* LEGE X-001, con sus respectivos grupos control. Tras 48 horas de exposición, las plantas se recogieron para la determinación de MC-LR ó CYN por test ELISA en raíces y hojas. Los resultados obtenidos muestran que MC-LR y CYN pueden acumularse en plantas de arroz, transmitiéndose a través de la cadena alimentaria.

Palabras clave: Consumo, microcistina LR, cilindropermopsina, *Oryza sativa*.

Agradecimientos: Los autores agradecen la beca concedida por el programa José Castillejo a la Dra. Ana Isabel Prieto para la realización del presente estudio

C4) ALTERACIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PECES DE CONSUMO HUMANO EXPUESTOS A DOSIS REPETIDAS DE CILINDROSPERMOPSINA. Guzmán-Guillén, R.; Prieto, A.I.; Fernández-Blanco, C.; Llana, M.; Moreno, I.M.; Cameán, A.M. Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

La presencia de *Aphanizomenon ovalisporum*, cianobacteria productora Cilindropermopsina (CYN), se está convirtiendo en un importante problema de seguridad alimentaria por la acumulación de esta toxina en pescados de consumo humano. CYN inhibe la síntesis de proteínas y está involucrada en la producción de estrés oxidativo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la peroxidación lipídica (LPO), oxidación de proteínas, oxidación de ADN y cambios en los contenidos de glutatión (GSH/GSSG) en hígado de tilapias (*Oreochromis niloticus*) expuestas a dosis repetidas de CYN mediante inmersión. Para ello, se establecieron nueve grupos (n=8) de tilapias: 3 grupos control y 6 grupos expuestos a 10 µg CYN/L (3 mediante cultivo y 3 mediante liofilizado de *A. ovalisporum* LEGE X-001) durante 8, 14 y 22 días, tras los cuales fueron sacrificadas. De los resultados obtenidos se concluye que se induce la producción de estrés oxidativo en hígado de tilapias expuestas a dosis repetidas de 10 µg CYN/L principalmente durante un periodo de 8 días, y mediante cultivo frente a liofilizado de *A. ovalisporum*. La LPO y oxidación de proteínas aumentan a los 8 días, mientras que son necesarios 14 días para la oxidación de ADN. Además, se observa una

disminución significativa del balance GSH/GSSG en los tres periodos de exposición.

Palabras clave: Cilindropermopsina, Estrés oxidativo, tilapias, consumo

Agradecimientos: Los autores agradecen al Ministerio de Educación e Innovación (CICYT,AGL2009-10026ALI) y a la Junta de Andalucía (P09-AGR-4672) la financiación del presente estudio.

C5) USO DE UN AGENTE QUIMIOPROTECTOR FRENTE A LAS ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS INDUCIDAS POR CILINDROSPERMOPSINA EN HIGADO DE TILAPIAS (*Oreochromis niloticus*). Gutiérrez-Praena, D.¹; Pichardo, S.¹; Jos, A.¹; Prieto, A.I.¹; Moyano, R.²; Blanco, A.³; Vasconcelos, V.^{4,5}; Cameán, A.M.¹. ¹Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González 2, 41012, Sevilla. (dgpraena@us.es). ²Departamento de Farmacología, Toxicología y Medicina Forense, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Carretera Madrid-Cádiz s/n, 14071, Córdoba. ³Departamento de Anatomía y Anatomía y Patología Comparativa. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Carretera Madrid-Cádiz s/n, 14071, Córdoba. ⁴Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Oporto. Rua do Campo Alegre, Porto, 4169-007, Portugal. ⁵Centro Interdisciplinar de Investigación Marina y Ambiental – CIIMAR/CIMAR, Universidad de Oporto. Rua dos Bragas, 289, 4050-123 Porto, Portugal.

La Cilindropermopsina (CYN) es una cianotoxina citotóxica producida por numerosas especies de cianobacterias, entre las que se encuentra *Aphanizomenon ovalisporum*. Por sus propiedades fisicoquímicas es una toxina capaz de resistir una gran variedad de condiciones ambientales, sumado a que se encuentra en su mayor parte (90%) disuelta en el medio acuoso, lo cual conlleva un elevado riesgo de exposición tanto para los animales y plantas acuáticos como para los seres humanos, por consumo de alimentos y agua contaminados. En este sentido, se ha demostrado que la exposición a CYN puede causar daños diversos a través de diferentes mecanismos de acción tales como la inhibición de la síntesis de proteínas y de glutatión reducido (GSH), genotoxicidad e inducción de estrés oxidativo. Para contrarrestar algunos de estos daños, se empleó N-acetilcisteína (NAC), un precursor del GSH que actúa por dos mecanismos diferentes: a) estimulación de la síntesis del GSH y b) unión a las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por la acción de la CYN. En el presente trabajo, se investigaron los posibles daños histopatológicos producidos en hígado de tilapias (*Oreochromis niloticus*) por parte de una única dosis de 200 µg/Kg pc de CYN pura y CYN procedente de un cultivo liofilizado de *A. ovalisporum*, así como el posible papel protector de un pretratamiento con diferentes dosis de NAC (0, 22, 45 mg/pez/día) durante siete días, frente a estos daños. Ambos productos (CYN y NAC) fueron administrados junto con la comida. Tras 24 h de la exposición a CYN, los peces fueron sacrificados y se extrajo el órgano objeto del estudio histopatológico (hígado). Los resultados mostraron que en los dos grupos tratados con CYN había una gran acumulación de vesículas lipídicas, siendo mucho más marcada en aquellos peces tratados con CYN procedente del liofilizado. Del mismo modo, no se observaron alteraciones en el grupo control pretratado con la dosis más elevada de NAC. En los grupos de peces tratados con CYN y las diferentes dosis de NAC, se comprobó que con la dosis de 22 mg de NAC se reducían los daños pero aún quedaba

un cierto contenido de glucógeno, mientras que en los peces pretratados con 45 mg/pez/día las alteraciones desaparecían, confirmando de esta forma el papel quimioprotector de la NAC frente a los daños producidos por CYN en hígado.

Palabras clave: cilindrospermopsina, N-acetilcisteína, tilapia, *Aphanizomenon ovalisporum*

Agradecimientos: los autores quieren agradecer a la Junta de Andalucía (P09-AGR-04672) y al Ministerio de Ciencias e Innovación (AGL2009-10026) por las ayudas económicas concedidas para este estudio.

C6) PRESENCIA DE FUSAROTOXINAS EMERGENTES Y TRICOTECENOS EN CEREALES Y ALIMENTOS DERIVADOS DE CEREALES COMERCIALIZADOS EN ITALIA. Juan, C.¹; Ritieni, A.²; Mañes, J.¹; Font, G.¹.¹Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain. ²Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Naples "Federico II", Via Domenico Montesano, 49, 80131, Napoli, Italy.

Uno de los riesgos alimentarios de actualidad son las micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium* (fusarotoxinas), como recogen los informes recientes realizados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) debido a su acumulación a lo largo de la cadena alimentaria, la exposición crónica a las mismas y su toxicidad [1]. Por ello el Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH) ha establecido una ingesta diaria tolerable (TDI) para el deoxinivalenol de 1 µg/kg pc, una TDI provisional de 0,7 µg/kg pc para el nivalenol, y una TDI combinada provisional de 0,06 µg/kg pc para las toxinas T-2 y HT-2. En este trabajo se ha evaluado la presencia de catorce fusarotoxinas (ocho tricotecenos: diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2 y HT-2, desoxinivalenol (DON), neosolaniol (NEO), nivalenol (NIV) y acetilados derivados de desoxinivalenol como 3-acetildesoxinivalenol (3-AcDON) y 15-acetildesoxinivalenol (15-AcDON) y seis fusarotoxinas emergentes: la beauvericina (BEA) y las enniatinas (ENs) A, A1, B, B1 y B4) en 147 muestras entre las que se incluyeron diferentes cereales y harinas de cultivo ecológico (trigo, avena, cebada y centeno), y productos derivados de cereales (pasta y alimentos infantiles) comercializados en la región de Campania en Italia. El análisis se realizó según el método de extracción de C. Juan et al. (2012) y la determinación por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem [3]. Los resultados obtenidos fueron: presencia de tricotecenos en cereales de cultivo ecológico en un 53%, mientras que en pastas y alimentos infantiles, un 58% y un 70%, respectivamente. Se encontró mayoritariamente presencia de FUS-X y DON, no superándose en ningún caso los niveles máximos permitidos para DON (750, 750 y 200 µg/kg, en cereales, pasta y alimentos infantiles, respectivamente [2]). Las fusarotoxinas emergentes estuvieron presentes en un 52% de los cereales de cultivo ecológico y pasta, y un 73% en alimentos infantiles, encontrándose mayoritariamente ENB y ENA1.

Palabras Clave: tricotecenos, agricultura ecológica, alimentos infantiles, pastas y fusarotoxinas emergentes.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto AGL 2010-17024/ALI del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España. C. Juan agradece a la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana por la ayuda postdoctoral del "Programa VALi+d per a investigadors en fase postdoctoral (APOSTD) 2010".

[1] EFSA Journal 2011;9 (12):2481 [187pp].

[2] Commission Regulation (2007). Commission Regulation (EC) No 1126/2007. Official Journal of the European Union, L255/14.

[3] Juan C., Ritieni A., Mañes J. (2012) Food Chemistry, 134 (4) 2389-2397.

C7) APROXIMACIÓN A LA EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN SÉMOLAS DE TRIGO. Rodríguez, Y.; Berrada, H.; Mañes, J.; Font, G. Área de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, España.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos capaces de contaminar los alimentos y piensos bajo condiciones determinadas. Varios trabajos de revisión han puesto de manifiesto la necesidad de hacer una aproximación de la evaluación del riesgo de las micotoxinas basándose en la evaluación analítica de su presencia en los alimentos, los límites establecidos por la legislación (límite máximo e ingesta diaria tolerable) y los datos disponibles de consumo de la población. En el presente trabajo se optimiza y se valida un procedimiento analítico para la determinación de 10 micotoxinas incluyendo patulina, zearalenona y ocho tricotecenos (nivalenol, diacetoxiscirpenol, fusarenon-x, neosolaniol, deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, T-2 y HT-2) en 30 muestras de sémolas de trigo adquiridas en supermercados de la ciudad de Valencia. El método está basado en una extracción QuEChERS modificada seguida de una determinación de los analitos seleccionados mediante cromatografía gaseosa acoplada a un triple cuadrupolo permitiendo una identificación en tándem (GC-MS/MS). Los resultados muestran la presencia de algunas micotoxinas en un alto porcentaje de las muestras analizadas, siendo el deoxynivalenol y la HT-2 las toxinas más predominantes. Sin embargo, el contenido medio hallado (21,47 µg Kg⁻¹ y 8,62 µg Kg⁻¹, respectivamente) no sobrepasa los límites máximos legislados en ninguna de las muestras. 3-acetyl-deoxynivalenol y nivalenol se detectaron con una incidencia menor y contenidos medios de 4,38 µg Kg⁻¹ y 11,98 µg Kg⁻¹, respectivamente. La evaluación del riesgo de estas micotoxinas en sémolas pone de manifiesto que la ingesta total estimada en adultos es muy inferior a la ingesta diaria tolerable. No obstante, se debe prestar especial atención a grupos de riesgo, como los niños, donde la ingesta total estimada de estas micotoxinas es doce veces mayor que en adultos, como resultado del alto consumo de estos alimentos y su bajo peso corporal. En un tercio de las sémolas analizadas se encontró presencia simultánea de entre dos y cuatro micotoxinas y por ello, posibles efectos sinérgicos o aditivos deben tenerse en cuenta para el establecimiento de los límites máximos de micotoxinas presentes en una muestra.

Palabras clave: evaluación del riesgo, micotoxinas, niños, sémola de trigo, GC-MS/MS

Agradecimientos: Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación la financiación para la realización del presente estudio (AGL2010-17024/ALI). Y. Rodríguez agradece la beca F.P.U. (No. AP2010-2940) proporcionada por el Ministerio de Educación

C8) OPTIMIZACIÓN DEL METODO QUECHERS PARA EL ANÁLISIS DE DIECISÉIS MICOTOXINAS EN FRUTAS DESECADAS. Azaiez, L.; Giusti, F.; Mañes, J.; Font, G.; Fernández-

Franzón, M. Laboratorio de Toxicología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Av. Vicent A. Estellés s/n, 46100 Burjassot

Las micotoxinas son sustancias producidas por determinados hongos filamentosos como producto de su metabolismo secundario. Existen alrededor de 300 micotoxinas conocidas, presentando gran diversidad estructural entre ellas. Algunas de estas micotoxinas presentan propiedades tóxicas, siendo peligrosa su ingestión tanto para humanos como animales. La agencia internacional de investigación del cáncer (IARC) ha clasificado algunas micotoxinas dentro del grupo 1 (carcinógenas en humanos). El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un método analítico rápido que permita la determinación de dieciséis micotoxinas en pasas y dátiles. La Unión Europea ha establecido como límite máximo 4 mg/kg para las aflatoxinas totales en frutas desecadas y productos derivados y 10 mg/kg de ocratoxinas en uvas. El método consiste en una modificación del método QUECHER, para ello se realiza una extracción en 5 gramos de muestra con una mezcla acetonitrilo:agua (80:20) acidificada al 1% mediante agitación mecánica, y posterior adición de NaCl para conseguir el “salting-out” y MgSO₄ para reducir el contenido de agua en la muestra. En la purificación se estudiaron distintas fases como el C18 y el cianuro. La espectrometría de masas se realiza con un analizador de triple cuadrupolo trabajando en modo SRM, provisto de una interfase electrospray. El método fue validado mediante fortificación de muestras blanco de pasas a distintos niveles. La cuantificación se llevó a cabo utilizando calibrado en matriz. Las recuperaciones obtenidas estuvieron dentro del rango 60-110%, con desviaciones estándar menores del 20%. El método ha sido aplicado para el análisis de muestras reales. La selección de 2 transiciones (QqQ) junto con su ion ratio y el tiempo de retención han sido utilizados como criterio de confirmación.

Palabras clave: micotoxinas, triple cuadrupolo, pasas, Quechers, optimización.

Agradecimientos: Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010/17024/ALI)

Referencias: Frenich AG, Romero-González R, Gómez-Pérez ML, Vidal JL. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2011; 1218: 4349-4356.

C9) STUDY OF 5-HYDROXYMETHYL FURFURAL AND COLOUR MODIFICATIONS IN PACKED PINNEAPLES DURING STORAGE AT DIFFERENT TEMPERATURES.

¹Barba, F.J.; ²Esteve, M.J.; ³Frigola, A. ¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avda. Agustín Escardino, 7. 46980 Paterna. Spain. ²Department of Nutrition and Food Chemistry, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot. Spain. ana.frigola@uv.es

During storage, pineapples suffer an important number of deterioration reactions (ascorbic acid degradation, cloud loss, microbial spoilage, development of off-flavour, changes in colour, texture, appearance), with an important quality loss. The presence of furfural and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in stored pineapples is an indicator of their quality loss; furfural and HMF are related with the browning of the fruit, and they are also good indicators of the excess of temperature and storage time in some food. Consequently, the analysis of these compounds has special importance in the food

industry. A few inadequate conditions during thermal treatment and during storage of the fruit reflect on an increase of the concentration of the different derivatives of furfural, formed by the degradation of reducing sugars or by Maillard's reaction, and, in addition, changes in colour. The aim of the present work was to evaluate colour modifications and 5-hydroxymethyl furfural in packed pineapples during 2.5 months at different storage temperatures (37 and 50 °C). HMF content was measured using the method described by IFFJP (1984). The colour was measured by a spectrophotometer Hunter Lab Labscan. The parameters of the CIELAB system studied are: L* (lightness [0=black, 100=white]), a* (-a*=greenness, +a*=redness) and b* (-b*=blueness, +b*=yellowness) values were used to calculate the total colour differences ($E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$), where ΔL^* , Δa^* , and Δb^* are differences between the stored (2.5 months at 37 and 50 °C) and the fresh samples. Differences in perceivable color can be classified analytically as not noticeable (0–0.5), slightly noticeable (0.5–1.5), noticeable (1.5–3.0), well visible (3.0–6.0), and great (6.0–12.0) (Calvo, 2004). With regard to CIELAB parameters, a significant increase was found for a* (-2.78), b* (18.60) and L* (38.78) values during 2.5 months storage at 37 and 50 °C, although this increase was higher for the samples stored at 50 °C. Comparison of the results obtained at the end of the storage, showed that measurement of the increase in total colour differences (E^*) after each storage conditions gave values of 19.11 and 30.28 in the samples stored at 37 and 50 °C, respectively. When the possible correlation (Pearson's test) between HMF and colour parameters was studied, it was found that there was a positive correlation ($p < 0.05$) between total colour differences and HMF content.

Keywords: Pineapple; Storage; Temperature; 5-hydroxymethyl furfural; Colour.

Acknowledgements. This research project was supported by EDV Packaging.

Calvo, C. (2004). Optical properties. In L. M. L. Nollet (Ed.), Handbook of food analysis. Physical characterization and nutrient analysis (pp. 1–19). New York: Marcel Dekker.

International Federation of Fruit Juice Producers (IFFJP). (1984). *Analysen analyses* (pp. 1–2). Zug, Switzerland: Fruit Union Suisse Association, Svizzera Frutta.

C10) DETECCIÓN DE MICOTOXINAS Y SUS PRINCIPALES METABOLITOS EN LECHE HUMANA EMPLEANDO TECNOLOGIA ORBITRAP. *Rubert, J.¹; Soler, C.¹; León, N.²; Yúsà, V.²; Mañes, J.¹ Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública. Facultat de Farmàcia. Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n. 46100, Burjassot, Spain. ²Public Health Research Center of Valencia (CSISP), Av. Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain*

La presencia de contaminantes en leche humana es uno de los problemas más graves de seguridad alimentaria, ya que la leche es el único alimento ingerido durante un periodo por los lactantes. Debido a ello esta población es extremadamente vulnerable ya que la calidad de la leche es un factor primordial para su correcto desarrollo. En diferentes estudios se ha demostrado la presencia de diferentes micotoxinas, principalmente AFM₁ y OTA en concentraciones variables. Estas micotoxinas pueden ser bien acumuladas, excretadas directamente o metabolizadas. A pesar de la constante demanda de análisis rutinarios sobre este tema, son pocos los estudios realizados sobre este alimento. Por ello, el objetivo del presente estudio ha sido

desarrollar un método de análisis simultáneo de 25 micotoxinas en leche humana. Para ello se recogieron 20 muestras de leche humana procedentes de un banco de leche y suministrada por donantes sanas. Para su extracción se empleó el método QUECHERS modificado adicionando 10 ml de acetonitrilo a 10 ml de muestra. Después de agitar, se adicionan las sales, se centrifuga y el sobrenadante obtenido es analizado. Para la detección se empleó un cromatógrafo líquido acoplado a un detector Orbitrap. Los resultados mostraron que el método de extracción QUECHERS desarrollado alcanzaba los criterios analíticos de recuperación y reproducibilidad establecidos por la Unión Europea (2002/657/EC) para las 25 micotoxinas estudiadas. Además, la tecnología Orbitrap, nos permitió, mediante un análisis retrospectivo de los resultados, la búsqueda de la presencia de micotoxinas no seleccionadas, como son sus metabolitos o conjugados, mediante la confirmación de su masa exacta.

Palabras clave: Micotoxinas; leche humana; orbitrap.

C11) ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN BRANQUIAS DE ZEBRAFISH (DANIO RERIO) COMO BIOMARCADOR DE LA EXPOSICIÓN AL BISFENOL-A. Lora, A.¹; Molina, A.¹; Hurtado, R.¹; Ayala, N.¹; Blanco, A.²; Moyano, R.¹. ¹Dpto. Farmacología, Toxicología, y Medicina legal y Forense. Universidad de Córdoba. ²Dpto. Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Universidad de Córdoba.

El bisfenol-A (BPA) es un contaminante habitual de alimentos que se incorpora a partir de las resinas epoxi y los policarbonatos utilizados en la fabricación de los envases y contenedores de alimentos, botellas, biberones, etc. Esta sustancia, incluida en la lista de sustancias autorizadas para la fabricación de plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos (Directiva 2002/72/CE), ha sido prohibida recientemente en los biberones de plástico por sus posibles efectos perjudiciales para la salud de los niños (Directiva 2011/8/UE). Esto hace pensar que es necesario el desarrollo de nuevas herramientas, nuevos biomarcadores y nuevos modelos que nos permitan estudiar de forma rápida y fiable la toxicidad del BPA, y evaluar el riesgo de su presencia en los alimentos. En este estudio se emplearon 30 zebrafish machos de 16 semanas de edad, distribuidos al azar en 3 lotes: grupo control (n=10) y dos grupos tratados (n=20), expuestos a 10 y 1000 µg/L de BPA durante 14 días. Tras el sacrificio con una solución de MS-222, las branquias se fijaron en formol y glutaraldehído para su posterior estudio histopatológico. Al microscopio óptico, las branquias de los zebrafish expuestos a 10 µg/L, mostraron evidentes procesos de edema e hiperemia en las lamelas junto a microhemorragias. Al microscopio electrónico de barrido se observó una degradación de la superficie de las lamelas. Los animales expuestos a una concentración de 1000 µg/L mostraron estructuralmente lesiones semejantes al grupo anterior aunque más severas, evidenciándose además de los procesos de edema e hiperemia, procesos inflamatorios. Al microscopio electrónico de barrido se observaron células exudativas inflamatorias, así como la desorganización de los filamentos basales. Estos resultados demuestran la idoneidad de esta especie como modelo experimental, y sugieren que las alteraciones histopatológicas del BPA sobre las branquias en zebrafish serían un posible biomarcador de la exposición a este compuesto.

Palabras clave: Bisfenol-A, Zebrafish, Branquias, Biomarcador

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa. Junta de Andalucía (Proyectos de

Excelencia) P09-AGR-5143

C12) CARACTERIZACIÓN DE VINOS FINOS PROCEDENTES DE LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN DE CONDADO DE HUELVA, EN FUNCIÓN DE SU CONTENIDO METÁLICO, CON FINES DE SEGURIDAD ALIMENTARIA. Álvarez¹, M.; Moreno^{1*}, J.M.; Pichardo¹, S.; Cameán¹, A.M.; Gustavo González², A. ¹Área de Toxicología, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. ² Departamento de Química Analítica. Facultad de Química. Universidad de Sevilla.

La población general suele estar expuesta a los metales a través de los alimentos y bebidas. Por este motivo el conocimiento del contenido metálico en estas matrices podría servir como indicador de una posible exposición tóxica en consumidores normales y en consumidores habituales. El objetivo de este estudio fue analizar el contenido metálico de cincuenta vinos procedentes de la denominación de origen (DO) Condado de Huelva con el fin de caracterizar los vinos de esta DO en función de su perfil metálico para estudios futuros de diferenciación de finos procedentes de otras DO y evaluar la posible exposición humana a estos metales a través de la ingesta de estos vinos. Para ello se midieron doce elementos (Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Sr and Zn), mediante Espectrometría de Emisión Atómica por Plasma (ICP-OES). Previamente, las muestras fueron digeridas por vía húmeda mediante la aplicación de calor y una mezcla de H₂O₂/HNO₃. Los elementos analizados no siguen una distribución normal tras la aplicación de los ensayos típicos de normalidad (Lilliefors, Shapiro-Wilk-Chen y Kolmogorov-Smirnov), por lo que los posteriores cálculos estadísticos se hicieron siguiendo técnicas no paramétricas. Las medianas de cada uno de los elementos medidos en las muestras fueron las siguientes expresadas en mg/L: 2.54 (Al); 0.06 (Ba); 82.58 (Ca); 0.21 (Cu); 3.53 (Fe); 865.34 (K); 68.87 (Mg); 0.71 (Mn); 32.77 (Na); 71.61 (P); 0.48 (Sr); 0.56 (Zn). El estudio de correlación entre pares metálicos se llevó a cabo mediante la técnica no paramétrica de Spearman, resultando las correlaciones más importantes, las que se dan entre los siguientes pares metálicos: Fe/Al, P/Mg, y Zn/Ba. Como resultado del presente estudio se puede decir que la contribución de los elementos estudiados a través de la ingesta de este tipo de vinos a los límites de seguridad (por semana) no son significativos, oscilando entre el 0,1% del Fe y el 11,9% del Mg, para bebedores normales.

Agradecimientos: Grupo CTS358 del Plan Andaluz de Investigación (PAIDI)

Palabras clave: Vinos, D.O. Huelva, contenido metálico, ICP-OES.

C13) CONTRIBUCIÓN DEL CONSUMO DE MANGOS PROCEDENTES DE CULTIVOS ORGÁNICOS vs CONVENCIONALES A LA EXPOSICIÓN DIETÉTICA DE Co, Mn y Ni. Hernández-Sánchez, C.¹; Luis, G.¹; Moreno, I.^{2*}; Cameán, A.²; González, A.G.³; González-Weller, D.⁴; Castilla, A.¹; Gutiérrez, A.¹; Rubio, C.¹; Hardisson, A.¹. ¹Área de Toxicología. Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna. Tenerife. ²Área de Toxicología, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. ³Departamento de Química Analítica. Facultad de Química. Universidad de Sevilla. ⁴Laboratorio de Salud Pública. Santa Cruz de Tenerife.

Una de las razones que justifican el estudio del contenido metálico en alimentos reside en sus implicaciones toxicológicas. Tanto los macroelementos como los elementos traza juegan un importante

papel en la salud humana. La contaminación metálica de ciertos alimentos procedentes de cultivos, puede venir dada por factores medioambientales, polución, condiciones atmosféricas, suelo, modo de cultivo, etc. Por eso es interesante establecer niveles de algunos de estos elementos minerales en cultivos, ya que a elevadas concentraciones, podrían ser peligrosos y tóxicos. El objetivo de este estudio es establecer el perfil metálico de mangos procedentes de la isla de la Gomera (Islas Canarias), cultivados en la misma región geográfica siguiendo dos métodos diferentes de cultivo (convencional y orgánico), con la idea de establecer la contribución del consumo de esta fruta a la exposición dietética de determinados metales, como Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Zn, haciendo especial hincapié en los de mayor interés toxicológico como son Co, Mn y Ni. Las medias de cada uno de los elementos fueron similares en los dos tipos de cultivos, encontrándose sólo diferencias significativas entre cultivo convencional y orgánico en los niveles de Fe ($1,97 \pm 1,44$ vs $2,76 \pm 1,26$); K ($146,60 \pm 97,97$ vs $112,03 \pm 45,57$); Ni ($0,07 \pm 0,03$ vs $0,05 \pm 0,03$) y Zn ($0,20 \pm 0,18$ vs $0,13 \pm 0,06$). Como resultado del presente estudio se puede establecer que sólo el Ca y el Mg superarían los límites de seguridad (por semana) establecidos, siempre que un individuo consumiera mango como única fruta en su dieta y cumpliera la ingesta media establecida en la "Guía de Alimentación Saludable" del Ministerio de Sanidad. Sin embargo, para una dieta variada, la exposición dietética a estos elementos a través del mango sería segura.

Palabras clave: mangos, metales, exposición dietética, Co, Mn, Ni

TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

Comunicaciones orales.

Moderadores: María José González Muñoz y Arturo Hardisson de la Torre

01) EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN POLEN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM. Daniela, I.¹; Rodríguez², Y.; Berrada, H.²; Mañes, J.²; Cuciureanu, R.¹; Font, G.². ¹Department of Environmental and Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, University Medicine and Pharmacy "Grigore T. Popa", Iasi, Rumania. ²Área de Toxicología, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España

El polen tiene una elevada proporción de proteína y de hidratos de carbono y una elevada proporción de fitosteroles, componentes funcionales que se relacionan con efectos beneficiosos para la prevención de enfermedades cardiovasculares, además de propiedades antioxidantes y estimulantes del sistema inmunitario. El polen, por lo tanto, se considera un alimento saludable y se emplea como potente enriquecedor, estimulante y energético. Sin embargo la calidad del polen depende del estado de conservación ya que se recolecta durante la floración de las plantas, y aspectos como el contacto con el ambiente y con insectos pueden favorecer modificaciones en la cantidad de agua, aumentando el riesgo de multiplicación de hongos. El polen cosechado de las explotaciones apícolas se puede ver contaminado durante el proceso de producción y almacenamiento con micotoxinas, metabolitos secundarios de hongos potencialmente toxigénicos. El objetivo del presente trabajo es identificar y cuantificar el grado de contaminación con micotoxinas en 20 muestras de polen obtenidas en la ciudad de Valencia. Para ello se optimiza y se valida un procedimiento analítico

para la determinación de 10 micotoxinas incluyendo patulina, zearalenona y ocho tricotecenos (nivalenol, diacetoxyscirpenol, fusarenon-x, neosolaniol, deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, T-2 y HT-2) en muestras de polen. El método está basado en una extracción QuEChERS modificada seguida de una determinación de los analitos seleccionados mediante cromatografía gaseosa acoplada a un triple cuadrupolo (GC-MS/MS). Los parámetros de validación estudiados tales como, linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación avalan que la metodología desarrollada es repetible, precisa y robusta, con unas datos de recuperación del 75-120 % y unos límites de cuantificación por debajo de 10 µg/kg. Los resultados mostraron una mayor presencia de las micotoxinas estudiadas en las muestras manejadas a granel que en las envasadas, siendo el contenido hallado inferior a los límites establecidos para estas micotoxinas en matrices alimentarias.

Palabras clave: Polen, micotoxinas, GC-MS/MS

Agradecimientos: Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación la financiación para la realización del presente estudio (AGL2010-17024/ALI). Y. Rodríguez agradece la beca F.P.U. (No. AP2010-2940). I. Daniela agradece al proyecto POSDRU/88/1.5/S/63117 la estancia y participación en el presente trabajo.

02) ESTRATEGIA PARA LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE MEZCLAS COMPLEJAS MEDIANTE EL USO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS*. Pillco, A.; de la Peña, E. *Mutagénesis Ambiental, ICA. Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC. Serrano 115, 28006 Madrid. España (epena/ica.csic.es)*

La evaluación toxicológica de mezclas complejas (MC) está adquiriendo gran interés dado que se ha demostrado que los efectos toxicológicos de las sustancias simples varían cuando se encuentran en forma de mezclas. Evaluar el efecto tóxico de MC es importante por la potencial peligrosidad para el ser humano y el ambiente. Los lodos que provienen de las estaciones de depuración de aguas residuales son MC que en los últimos años están siendo utilizados como enmiendas agrícolas y también están siendo valorizados mediante procesos físico químicos como, para obtener productos con alta capacidad energética. El objetivo de este trabajo es proponer una estrategia de ensayos para evaluar la toxicidad de extractos de lodos que se aplican en agricultura y de los derivados valorados que se obtienen a partir de lodos, mediante métodos alternativos a la experimentación animal. Los ensayos de ecotoxicidad de bioluminiscencia en *Vibrio fischeri* y de germinación en semillas de *Lepidium sativum*; para evaluar la genotoxicidad, se emplea el ensayo de *Salmonella*/microsoma que utiliza las cepas TA98, TA100, TA102 y TA104; y el ensayo de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster*, que emplea los cruces estándar y alta bioactivación. Los cuatro métodos alternativos nos muestran que constituyen una estrategia simple, rápida, económica, y sensible para evaluar MC. En conclusión los métodos alternativos nos permiten demostrar la existencia de riesgo ecotóxico, mutagénico y genotóxico producido por MC empleadas tanto en agricultura como en su valorización energética.

Palabras clave: Ecotoxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad, mezclas, métodos alternativos

Trabajo parte de la Tesis Doctoral de la Dra. Araceli Pillco Tito, titulada "Evaluación Toxicológica de Mezclas Complejas Mediante Ensayos Alternativos a la Experimentación Animal de

Genotoxicidad, Mutagenicidad y Ecotoxicidad”, defendida en la Universidad Autónoma de Madrid (noviembre, 2011)

03) VARIACIÓN TEMPORAL DE METALES Y METALOIDES EN SUELOS URBANOS. *González Muñoz, M.J.; Mateos Vega, C.J.; Peña Fernández, A. Departamento de Nutrición, Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá.*

El suelo es un recurso natural no renovable que constituye el asiento natural de las actividades humanas. Su protección no se ha fomentado en la misma medida que la del aire y el agua, ya que los daños no se perciben hasta una fase muy avanzada, debido a su elevada capacidad de amortiguamiento, resiliencia y capacidad de filtrar y absorber contaminantes. Actualmente se van apreciando los signos e impactos, requiriendo medidas correctoras y preventivas. A diferencia de otros contaminantes que afectan al medioambiente, los metales son elementos que el hombre no crea ni destruye, sino que los introduce en el medio como consecuencia de las diferentes actividades antropológicas, de forma directa o alterada química o biológicamente. El objetivo de este estudio ha sido monitorizar la distribución de metales y metaloides en suelos de Alcalá de Henares (Madrid), y determinar su variación temporal. Para ello, se han recogido muestras de suelos urbanos de Alcalá de Henares (Madrid), realizando dos muestreos de suelo en el intervalo de un año en las que se han determinado Al, As, Be Cd, Cr, Cu, Mn Ni, Pb, Tl y Zn. La presencia de todos los metales ha aumentado de forma significativa en los antroposuelos en un año. Los contaminantes que han presentado el porcentaje de variación mayor han sido Be y Tl, seguidos de Pb y Cu. Por tanto, estos contaminantes se van acumulando con el tiempo en los suelos de las ciudades, debido al continuo proceso de urbanización y al aumento de la intensidad de las diferentes actividades antropogénicas, fuentes emisoras que se incrementan con el desarrollo económico.

04) INFLUENCIA DEL GÉNERO SOBRE LOS PARÁMETROS RENALES DE ESTRÉS OXIDATIVO COMO BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS EN CONEJO. *Calaco, E.; Ramos, A.; Pérez-López, M.; Míguez, M.P. Área de Toxicología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad s/n. 10003-Cáceres. E-mail: prado.miguez@gmail.com.*

Aproximadamente dos millones y medio de toneladas de plaguicidas son utilizados cada año en todo el mundo. La OMS ha establecido una media anual de unos tres millones de casos de intoxicaciones por plaguicidas en humanos, de los cuales 220.000 tienen un desenlace fatal. El presente estudio tiene como objetivo establecer los parámetros de estrés oxidativo que puedan servir como biomarcadores de contaminación ambiental por insecticidas organofosforados, así como estudiar la influencia del género sobre los mismos. Para ello se ha seleccionado como insecticida organofosforado el diazinón ampliamente utilizado para controlar insectos en el suelo, en plantas ornamentales y en cosechas de frutas y hortalizas. Se han utilizado 30 conejos de ambos sexos, divididos en 3 grupos de 10 individuos cada uno. Un grupo control que recibió p.o. el vehículo, y dos grupos que recibieron una dosis p.o. única de diazinón (25 y 125 mg/kg). A los 10 días después de la administración del diazinón los animales fueron sacrificados y se extrajo el riñón donde se determinó malondialdehído (MDA) y glutatión reducido (GSH), así como las actividades de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT) y glutatión-S-

transferasa (GST). Los resultados muestran que el diazinón indujo un aumento de MDA acompañado por una depleción de GSH, así como una disminución de la actividad CAT y GST. Estos efectos fueron más patentes en machos que en hembras, indicando que los machos muestran una mayor sensibilidad al estrés oxidativo inducido por este plaguicida. Sin embargo, tras la exposición al insecticida no se modificaron las actividades de las enzimas GPx y GR. Teniendo en cuenta todos estos resultados podemos concluir que el contenido de MDA y GSH, así como la actividad CAT en riñón de conejo, preferentemente machos, se pueden considerar como útiles biomarcadores de contaminación ambiental por organofosforados.

Palabras clave: biomarcador, estrés oxidativo, diazinón, organofosforado, ecotoxicología, riñón, conejo.

Agradecimientos: Ministerio de Educación y Ciencia, que ha subvencionado la realización del presente estudio (CTM2007-60041).

Comunicaciones tipo cartel

C1) EFECTOS NEUROLÓGICOS DEL CADMIO EN EL MODELO EMBRIO-LARVARIO DE PEZ CEBRA. *García Cambero, J.P. Área de Toxicología Ambiental. CNSA. ISCIII.*

La exposición elevada a cadmio (Cd) en animales y seres humanos se asocia generalmente con nefrotoxicidad (EFSA, 2009), aunque estudios más recientes han evidenciado también efectos neurotóxicos. En el caso de seres humanos, los niveles elevados de Cd se han asociado con retrasos mentales (Jiang et al. 1990; Marlowe et al. 1983), e incluso, un estudio reciente postula que podrían estar relacionados con hiperactividad relacionada con trastorno de la atención (Ciesielski et al., 2012). Sin embargo, el estudio recalca que se necesitarían estudios con animales para poder clarificar mejor la asociación “exposición cadmio-hiperactividad” y valorar cuáles son los momentos críticos en la exposición. Dado que el modelo de pez cebra se utiliza actualmente en la valoración de compuestos neurotóxicos, el objetivo de este estudio fue estudiar los efectos neurológicos del Cd en el modelo embrio-larval de pez cebra. Para ello, se realizaron ensayos de exposición a niveles subletales de Cd (3.3-0.3 mg/L) durante la fase de organogénesis del embrión y se estudiaron los efectos relacionados con el neurodesarrollo desde el día 0 hasta el día 7 de vida. Los resultados mostraron que la exposición a Cd produjo un aumento, dosis dependiente, de la actividad locomotora (distancia recorrida, velocidad media) de las larvas en el día 7 de vida, concordante con una hiperactividad. En conclusión, el modelo corrobora parte de los hallazgos encontrados en estudios epidemiológicos en seres humanos, mejorando el conocimiento de los efectos neurotóxicos del Cadmio.

C2) ANTIBIÓTICOS DE CONSUMO HUMANO EN EL MEDIO AMBIENTE. *Aguayo, S.¹; Lucena, M.A.¹; Corpa, C.¹; Herrera, S.².¹Centro Nacional de Sanidad Ambiental. Instituto de Salud Carlos III. ²Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.*

Desde hace unos años, se ha incrementado el interés por la presencia de residuos de medicamentos de consumo humano en el medio ambiente por el posible impacto que pudiesen provocar sobre la salud ambiental y a largo plazo sobre salud pública. La presencia de residuos de antibióticos en diferentes compartimentos ambientales resulta un hecho constatado, al igual que el incremento de aparición de poblaciones bacterianas resistentes en el medio ambiente. El

consumo humano sin prescripción médica de antibióticos, su baja tasa de metabolismo, su rápido mecanismo de acción aún a bajas dosis, su resistencia a los sistemas de tratamiento de aguas residuales y su llegada al medio de manera continuada, podría estar favoreciendo a bajas concentraciones, un incremento en la aparición de poblaciones bacterianas resistentes en el medio ambiente. La transferencia de los genes de resistencia se puede producir de manera inespecífica una vez se comparte nicho ecológico, de tal manera que se podría estar creando un almacén medioambiental de resistencias bacterianas que podría indirectamente afectar a la salud pública. En este estudio se presentan los primeros datos sobre niveles de los principales grupos de antibióticos que se consumen en España en lodos de depuradora, así como una caracterización de las principales poblaciones bacterianas resistentes que presentan. Se han seleccionado los lodos de depuradora como una de sus principales fuentes de emisión al medio ambiente ya que a través de su reutilización como enmienda orgánica en suelo (suelo agrícola o de parques y jardines) sirven de medio de dispersión de residuos de los principales grupos de antibióticos así como de las poblaciones bacterianas y sus genes de resistencia.

Palabras clave: antibióticos, medio ambiente, cromatografía, resistencias bacterianas

Este trabajo está financiado por el proyecto RTA2010-00066-C02-01

C3) IMPORTANCIA DE LOS RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN EXCRETAS ANIMALES. Carballo, M.; Aguayo, S.; González, M.; Vázquez, B.; Esperón, F.; De la Torre, A. Centro de Investigación en Sanidad Animal. CISA-INIA. Valdeolmos, Madrid.

Las tetraciclinas es uno de los grupos de antibióticos más utilizados en la producción ganadera. En nuestro país, datos recientes, nos muestran que se emplean anualmente unas 344 tn. La asimilación de estas sustancias es baja, eliminándose por orina y heces más de un 70%. El uso de los estiércoles animales como fertilizantes, práctica agrícola común, favorece la incorporación a los campos agrarios de residuos de estos antibióticos y también de bacterias que pueden ser resistentes - principalmente enterobacterias abundantes en muestras fecales. Como consecuencia de esta situación, se están detectando principalmente en suelos, residuos de estos compuestos y genes de resistencia. En este trabajo se realiza una valoración sanitario-ambiental de esta situación, a partir del estudio de estiércoles de diferentes especies ganaderas. Se ha detectado en un alto porcentaje de los estiércoles analizados residuos de oxitetraciclina y clortetraciclina, así como un elevado porcentaje de resistencias bacterianas a tetraciclinas. Se discute la relevancia sanitario-ambiental de los resultados obtenidos

Este trabajo está financiado por el convenio S2009/AGR-1489 y el proyecto RTA2010-00066-C02-01.

C4) METALES PESADOS EN SANGRE DE POLLOS DE CIGÜEÑA BLANCA (*Ciconia ciconia*) DE MADRID Y ARAGÓN. Cabo, P.¹; Espín, S.¹; Martínez-López, E.¹; Roscales, J.L.²; Jiménez, B.²; García-Fernández, A.J.^{1*} ¹Área de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. *ajgf@um.es. ²Instituto de Química Orgánica General (IQOG) del CSIC. Madrid.

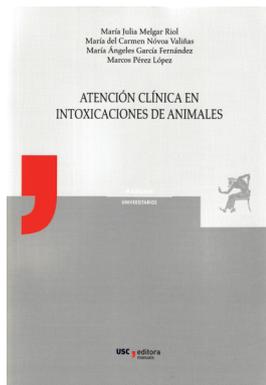
Se ha analizado la concentración de plomo (Pb) y mercurio (Hg) en sangre de 53 pollos de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) muestreados en el año 2008 en tres áreas de Madrid: norte (MN), centro (MC) y

sureste (MSE), y en los años 2010 y 2011 en Aragón. El Pb se analizó mediante voltamperometría de redisolución anódica (VA-757, Methrohm), y el Hg mediante un analizador directo de mercurio (DMA-80, Milestone). Las concentraciones medias encontradas en cigüeñas procedente de MN, MC, MSE y Aragón fueron 11,07; 10,50; 22,26 y 5,62 µg/dl de Pb respectivamente; y 32,45; 66,23; 74,97 y 4,08 µg/dl de Hg con diferencias significativas en las diferentes áreas estudiadas (p<0,001). Las mayores concentraciones de metales se encontraron en pollos procedentes de MSE, zona fuertemente industrializada con varios vertederos. En esta zona los niveles de Pb superan en 2,4-5 veces las concentraciones dadas por otros autores en otras áreas de España. Además, cuatro individuos de MSE y un individuo de MN superaron el nivel establecido para el Pb como causante de efectos subletales en aves (20 µg/dl). Respecto a las concentraciones de Hg, los pollos procedentes de Madrid tuvieron más de 10 veces las concentraciones encontradas en Aragón. Estudios experimentales en pollos han encontrado niveles de Hg en sangre de 66 µg/dl en aves tratadas con 0,4 ppm de Hg durante 5 semanas, por lo que probablemente las aves de MC y MSE estén expuestas a estos niveles o superiores. Además, el tratamiento de 0,4 ppm de Hg provoca efectos relacionados con estrés oxidativo y alteración metabólica del glutatión, y parece afectar al sistema inmune de los pollos. Los niveles de Pb y Hg a los que parece estar expuesta esta especie en el centro y sureste de Madrid podrían ser causantes de efectos subletales, por lo que se hace necesario continuar con los estudios en dicho área.

Palabras clave: Cigüeña blanca, *Ciconia ciconia*, plomo, mercurio, efectos.

Revisión de libros

Guillermo Repetto Kuhn. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla



Atención clínica en intoxicaciones de animales

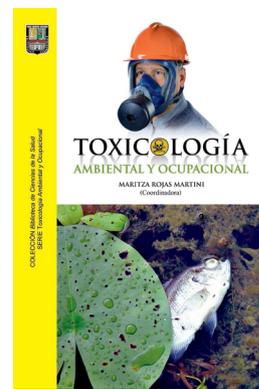
María Julia Melgar Riol, María del Carmen Nóvoa Valiñas, María Ángeles García Fernández y Marcos Pérez López.

Editorial: Universidade de Santiago de Compostela, 2012.

ISBN: 9788498878639, Páginas: 231

figura RVA

Se trata de una obra que aborda parte del programa clínico establecido para el alumnado de toxicología en el grado de Veterinaria. Además esta obra va también destinada al profesional veterinario, por cuanto el contenido recogido aborda con profundidad, amplitud y sentido práctico para formar, orientar y dirigir a los veterinarios en el ejercicio profesional. Es necesario para este objetivo contar con el apoyo de los centros de atención toxicológica veterinaria, que comienzan a afianzarse en España en su doble vertiente asistencial y analítica. Desarrollan una labor primordial, apoyando a los veterinarios, orientando y ayudando a identificar, tratar y prevenir correctamente las posibles patologías toxicológicas. Es un manual que orienta a los profesionales a la hora de atender animales con cualquier tipo de intoxicación. Comienza con un recorrido por la historia de la toxicología en sus diferentes campos de aplicación, con especial énfasis en los nuevos modelos de enseñanza y aprendizaje en el ámbito de la enseñanza de educación superior. A continuación considera las diferentes pautas de actuación en caso de sospecha de intoxicación, así como las pruebas requeridas para establecer un diagnóstico acertado. Por último, trata los métodos clínicos y de análisis que conducen a identificar de una forma adecuada y precisa el tóxico implicado. Los estudiantes de veterinaria, los veterinarios clínicos y los centros de atención toxicológica veterinaria encontrarán información esencial acerca de las intoxicaciones en animales y las medidas para su correcto diagnóstico y tratamiento. En el capítulo segundo se describen los procedimientos en toxicología clínica veterinaria, desde la valoración, estabilización inicial y el tratamiento sintomático de soporte, hasta la aproximación al diagnóstico toxicológico. El capítulo 3 comprende el tratamiento de las intoxicaciones, que se inicia con un tratamiento eliminador o de descontaminación toxicológica, seguido del tratamiento específico antidótico y con antagonistas. El capítulo 4 describe los servicios de toxicología y las fuentes de información. El capítulo 5 refiere la metodología de trabajo desde la sistemática clínica, a la toma de muestras, su remisión al laboratorio y los recursos instrumentales para realizar una sistemática analítica toxicológica, así como la emisión del informe toxicológico.



Toxicología ambiental y ocupacional.

Maritza Rojas Martínez coordinadora.

Editorial: Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela, 2011.

ISBN:978-980-233-526-8, Páginas: 533

figura RVB

Se trata de un libro coral escrito por 19 especialistas de América latina, con 22 capítulos de toxicología ambiental y ocupacional. Está prologado por el Dr. Darío Córdoba, que indica que "saber toxicología es una necesidad creciente". La Dra. Rojas observa que persisten los problemas detectados años atrás en la formación de los profesionales de salud y seguridad en el trabajo: algunos planes de estudio continúan desactualizados, existe una carencia de enfoque inter y multidisciplinar y una excesiva academia teórica, por encima de las necesidades de la organización del trabajo actual. En los países de América Latina existe una demanda creciente para la evaluación de la seguridad y el control regulatorio de agentes químicos, lo que crea la necesidad de nuevos toxicólogos o al menos, de profesionales formados adecuadamente en toxicología. En esta publicación se pretende describir una forma racional de enfocar la identificación y la solución de los problemas que acarrea la exposición a contaminantes ambientales. Se abordan las áreas tradicionales de la toxicología ocupacional y temas más específicos como la toxicología y su importante papel en la exposición laboral. Una obra que busca llenar un vacío en América latina. En su texto se desarrollan temas de la toxicología clásica, pero además se abordan nuevas especializaciones de esta ciencia que la coloca a la vanguardia de otras ciencias sofisticadas, por ejemplo: la toxicogenómica, la toxicología de la reproducción y el desarrollo, la neurotoxicología y la ecotoxicología, entre otros. Hoy en día la toxicología es una profesión por sí misma especializada, mediante la cual se aborda la problemática de varios millones de sustancias tóxicas disponibles para el hombre y que cada año se multiplica. El primer capítulo incluye referencias históricas del uso de agentes tóxicos, recordándonos a las célebres envenenadoras de todos los tiempos, que se sigue en la introducción a la toxicología ejemplos y accidentes de intoxicaciones masivas por agentes químicos. Las fases de la acción tóxica están comprometidas por la toxicocinética y biotransformación de las sustancias. La contaminación ambiental no solamente tienen efectos en la salud pública sino también sobre los ecosistemas. La toxicología ocupacional requiere el adecuado uso de los principios de monitoreo ambiental y biológico de agentes químicos. Este ambiente laboral también contempla el uso de drogas lícitas e ilícitas. A continuación se revisa la toxicología de metales, metaloides, plaguicidas, hidrocarburos y disruptores endocrinos.

XX CONGRESO ESPAÑOL DE TOXICOLOGÍA Y IV IBEROAMERICANO



SALAMANCA 26 AL 28 DE JUNIO DE 2013

Hospedería del Colegio Fonseca



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



<http://congresos.aetox.es/2013>

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

Los manuscritos, **en español o inglés**, se someterán por el editor a dos expertos que actuarán como revisores externos a la revista, cuyas observaciones se trasladarán al autor para la reescritura del original en caso de ser aceptados.

El texto debe ser claro y conciso, cuidando la ortografía y la utilización de abreviaturas (SI). Tanto la forma como el contenido deberán ser cuidadosamente revisados antes de su envío. Se utilizará **interlineado a doble espacio, letra tipo Times New Roman de 12 puntos, sin sangrías en los párrafos, con justificación completa**, con márgenes amplios, en tamaño DIN A4, preferiblemente en archivo Word. Todas las páginas irán numeradas correlativamente. El manuscrito se divide en los siguientes apartados:

Título descriptivo del artículo (no en mayúsculas) y **Title**, además de una versión corta del título.

Apellido/s e inicial/es del nombre del autor/es.

Institución/es donde se ha realizado el trabajo, distinguiéndolas con numerales en superíndice. Marcar con un asterisco el autor de contacto e incluir su correo electrónico, teléfono y fax.

Resumen y Abstract. Las versiones en español e inglés serán lo más informativas posible, en un solo párrafo, con una pequeña introducción, la identificación de los métodos, los resultados abreviados y particularmente las conclusiones del trabajo. Su lectura dará una idea clara del mismo. Ninguno debe sobrepasar las **250** palabras ni incluir abreviaturas, referencias o tablas.

Palabras Clave y Key Words tras cada resumen, con hasta cinco palabras separadas por comas. En artículos en inglés el orden es el inverso.

Introducción: descripción de los orígenes y bases del estudio.

Material y Métodos. Se evitarán descripciones de todo aquello que pueda encontrarse en la bibliografía citada. Deben describirse de forma concisa los individuos y series estudiados, criterios de selección, procedimientos, duración y número de repeticiones de los ensayos, equipo y materiales utilizados y cuantos datos puedan precisarse para la repetición del estudio. Deben especificarse las técnicas analíticas y los métodos estadísticos. Para sustancias químicas o fármacos se citará el nombre genérico conforme a la IUPAC. Si se utiliza una marca registrada, se hará constar el nombre genérico y el nombre del fabricante.

Resultados. Se presentarán las observaciones realizadas, sin interpretarlas, así como el análisis estadístico. Los datos numéricos se pueden presentar en tablas o figuras, pero sin repetirlos entonces en el texto.

Discusión: en ella se considerarán los resultados presentados comparándolos con otros publicados, las razones que apoyan la validez de los mismos, su aplicación práctica y las directrices para nuevas investigaciones.

Conclusiones. Breves obtenidas directamente del trabajo

Agradecimientos. Si fueran necesarios, particularmente a las entidades financiadoras.

Bibliografía. La exactitud de las referencias bibliográficas es responsabilidad de los autores. Sólo deberían incluirse referencias relacionadas estrechamente con el trabajo. *Se promoverá la citación de artículos previos publicados en la Revista de Toxicología.* Todas las referencias listadas deben ir citadas en el texto. Deberían evitarse citas como "observaciones no publicadas".

Las referencias irán numeradas por orden de aparición en el texto y

citadas numéricamente entre corchetes. Por ejemplo: [1], [2,9-13]. Al final del texto la bibliografía irá citada de la siguiente manera:

a) artículos de revistas: apellidos e iniciales de todos los autores, año, título completo, revista en su abreviatura normalizada, número de volumen y primera y última página y utilizando los signos de puntuación como en el ejemplo.

7. de la Peña E, Herrera A, Barrueco C, Canga C (1988) Sistemas de activación metabólica. Rev Toxicol 6: 33-38.

b) libros: apellidos e iniciales de los autores, año de publicación, título completo del libro, editorial, lugar de publicación y nº de páginas o, si se trata de un capítulo, apellidos e iniciales de los autores, año de publicación, título del capítulo, en: editores del libro, título completo del libro, editorial, lugar de publicación y primera y última página:

21. de la Peña E, Burguete I, Guadaño A (1999) Evaluación Mutagénica y Genotóxica. Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica, Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, MURCIA98. Madrid. pp. 398.

14. de la Peña E, Guadaño A, Repetto G (1999) Métodos alternativos y complementarios en experimentación animal. En: Pérez-García CC, Díez-Prieto L, García Partida P (cols) Introducción a la Experimentación y Protección Animal. León. Universidad de León. 215-223.

Tablas

·Deben ser tan claras y simples como sea posible

·Las tablas se incluyen tras la bibliografía, en páginas independientes, numeradas correlativamente (1,2...).

·Los títulos deben ser suficientemente descriptivos para hacerlos comprensibles sin necesidad de consultar el texto.

·La información adicional puede incluirse como nota al pie de tabla o figura.

·Las tablas debieran ser lo suficientemente cortas para evitar dividir las.

Figuras

·Los pies de las figuras deben incluirse en el documento principal del manuscrito, tras las tablas, numeradas consecutivamente (1,2...). Deben ser suficientemente descriptivos para hacerlos comprensibles sin consultar el texto

·Pero las figuras propiamente dichas se envían en archivos individuales. Las imágenes se enviarán digitalizadas, preferiblemente en formato TIFF o JPEG, de al menos 300 ppp. de resolución (pero no mucho más) para el tamaño final. La versión impresa de la revista no admite colores, por lo que las figuras debieran ser comprensibles en escala de grises. Los símbolos identificadores preferidos en las figuras son círculo, cuadrado y triángulo abiertos o llenos.

·Las figuras deben tener suficiente calidad. No contendrán los títulos ni referencia a su número ni tendrán innecesariamente espacio en blanco alrededor.

·Las señales y leyendas se pueden incluir dentro de los ejes de la figura.

·Las figuras publicadas previamente deben contar con el permiso escrito del titular de los derechos

La redacción de la revista se reserva el derecho de introducir modificaciones en los artículos recibidos, siempre que no alteren el sentido de los mismos, para adaptarlos al estilo de la revista.

Los trabajos se envían a través de la web:

<http://ojs.easyapps.es/index.php/revtoxicol>

accediendo por Identificación/Login o a través de Registro si no se ha utilizado antes

En el sistema se incluyen por separado el texto y las figuras.

Editor:

Guillermo Repetto Kuhn. Universidad Pablo de Olavide.

Dpto. Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

Ctra. de Utrera Km 1, 41013 - Sevilla, España

E-mail: revista/aetox.es

Editoras adjuntas:

M^a del Prado Míguez Santiyán. Universidad de Extremadura. Cáceres.

María José González Muñoz. Universidad de Alcalá. Madrid.



ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE TOXICOLOGÍA

Rev. Toxicol. 29 (1) 1-74 2012

ISSN 0212-7113

e-revist@s

<http://aetox.es>

Incluido en Scopus, Latindex, REDALYC, e-revis@s, IBECS, ICYT, IME, EMBASE/Excerpta Medica y Chemical Abstracts

Asociación Española de Toxicología

- Presidenta:** Dra. Guillermina Font Pérez
Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
- Vicepresidenta:** Dra. M^a Anunciación Lafuente Giménez.
Facultad de Ciencias. Campus de Orense. Universidad de Vigo.
- Secretaria:** Dra. M^a Aránzazu Martínez Caballero
Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid
- Internet:** <http://aetox.es>

Sección de Toxicología Clínica

Dr. Tomás Camacho García
(atcamacho@lemabandin.com)
Laboratorios Lema & Bandín. Vigo

Sección de Toxicología Ambiental

Dra. M^a José González Muñoz
(mariajose.gonzalez@uah.es)
Universidad de Alcalá. Madrid.

Grupo de Trabajo Especializado en Métodos Alternativos

Dr. Guillermo Repetto Kuhn
(grepkuh@upo.es)
Universidad Pablo de Olavide. Sevilla.

Sección de Toxicología Forense

Dra. María Luisa Soria Sánchez
(luisa.soria@mju.es)
Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias
Forenses. Sevilla

Sección de Seguridad Alimentaria

Dra. Ana Cameán Fernández
(camean@us.es)
Universidad de Sevilla. Sevilla.

Sección de Toxicología Veterinaria

Dr. Antonio Juan García-Fernández
(ajgf@um.es)
Universidad de Murcia. Murcia.

Revista de Toxicología (Editada desde 1983)

Editor

Dr. GUILLERMO REPETTO KUHN
Universidad Pablo de Olavide. SEVILLA
E-mail: grepkuh@upo.es

Editoras Adjuntas

Dra. M^a DEL PRADO MÍGUEZ SANTIYÁN
Universidad de Extremadura. CÁCERES
E-mail: prado.miguez@gmail.com

Dra. M^a JOSÉ GONZÁLEZ MUÑOZ
Universidad de Alcalá. MADRID
E-mail: mariajose.gonzalez@uah.es