



**UNIVERSIDAD JUAN AGUSTÍN MAZA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Y AMBIENTALES**

**DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE PLAGUICIDAS EN PEQUEÑOS
ANIMALES CON SIGNOS DE INTOXICACIÓN POR
ANTICOLINESTERÁSICOS**

AUTOR: Carina Alejandra Torres.

DIRECTOR: Dra. Nora B. M. Gorla.

Mendoza, 2017

INDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
INTRODUCCIÓN	1
La problemática de los animales intoxicados.....	1
Fisiología de la neurotransmisión colinérgica.....	2
Pesticidas.....	5
Clasificación toxicológica de los pesticidas.....	6
Pesticidas Inhibidores de la Acetilcolinesterasa.....	8
Plaguicidas que actúan a través de otros mecanismos	14
Análisis para la determinación de plaguicidas en laboratorios de baja complejidad	15
Plaguicidas en el Medio Ambiente.....	19
Objetivo	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Materiales.....	21
Animales controles	21
Animales con signos de intoxicación.....	21
Muestras biológicas.....	22
Métodos.....	24
Cromatografía en Placa Fina	24
Determinación de Butirilcolinesterasa	27
Análisis estadístico	27
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	34

CONCLUSIÓN	43
AGRADECIMIENTOS	44
BIBLIOGRAFÍA	45

ABREVIATURAS

- ACh: Acetilcolina
- Acetil CoA: Acetil coenzima A
- AChE: Acetilcolinesterasa
- BChE: Butirilcolinesterasa
- CB: Carbamatos
- CCF: Cromatografía en Capa Fina
- DTNB: Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzónico
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- FE: Fase estacionaria
- FM: Fase móvil
- IARC: International Agency for Research on Cancer (en español: Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer)
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OP: Organofosforados
- SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
- SNC: Sistema Nervioso Central

RESUMEN

La mortandad de animales domésticos en forma accidental o intencional como consecuencia de la intoxicación por pesticidas es elevada. Los caninos, felinos y aves se consideran buenos centinelas del uso de tóxicos en el medio natural, doméstico y urbano porque responden manifestando efectos tóxicos. Los pesticidas, generalmente asociados con estas situaciones, son organofosforados y carbamatos, inhibidores de la acetilcolinesterasa, utilizados en agricultura, industrias y domicilios. Algunos signos de intoxicación aguda por estos compuestos son hipersalivación, aumento de secreciones traqueobronquiales, vómitos, diarrea, miosis, convulsiones, paro cardíaco, insuficiencia respiratoria y muerte. Los organofosforados pueden producir además el síndrome intermedio y la neurotoxicidad retardada. Los efectos crónicos de estos compuestos están asociados con cáncer, disrupción endócrina, desórdenes inmunológicos, entre otros. El objetivo de esta investigación fue realizar la identificación confirmatoria u orientativa del agente causal de las intoxicaciones en animales, utilizando una técnica analítica y otra bioquímica de baja complejidad. El grupo de animales con signos de intoxicación estuvo formado por cinco caninos, un felino y dos aves. El período de toma de muestras estuvo comprendido entre Julio de 2016 y Abril del 2017. Las muestras analizadas incluyeron sangre, contenido gástrico y un cebo. Para la obtención de valores de referencia de la actividad butirilcolinesterasa el grupo control estuvo formado por 18 caninos adultos sanos. Se determinaron los niveles de butirilcolinesterasa plasmática utilizando el kit Colinesterasa de GT Lab®, método cinético por espectrofotometría a 405 nm. Para la técnica de cromatografía en capa fina se usaron placas de silicagel y pesticidas testigos organofosforados y carbamatos. En un canino fue identificado el insecticida carbámico aldicarb y en un canino y dos aves se identificó carbofuran. En nuestro país su uso se encuentra restringido. Se pudo confirmar que tanto la cromatografía en capa fina como la detección de la actividad butirilcolinesterasa son métodos accesibles y pueden ser incorporados fácilmente en laboratorios de baja complejidad. Debería promoverse la realización de un registro de los pesticidas más usados, e incentivar la creación de un registro epidemiológico de animales intoxicados.

ABSTRACT

Domestic animals mortality due to pesticides, accidental or intentionally produced is high. These animals are considered good sentinels of the toxics in the natural, domestic and urban environment. The pesticides generally associated with these situations are acetylcholinesterase inhibitors, such as organophosphates and carbamates, used in agriculture, industries and homes. Some signs of acute intoxication include hyper salivation, increased tracheobronchial secretions, vomiting, diarrhea, miosis, seizures, cardiac arrest, respiratory failure, and death. Organophosphates also can induce intermediate syndrome and delayed neuropathy. Chronic effects are associated with cancer, endocrine disruption and immune disorders among others. The objective of the project was to carry out the confirmatory or presumptive identification of the pesticide involved in animal intoxications using analytical and biochemical low complexity techniques in the period July 2016- April 2017. The group of animals with intoxication signs was formed by five canines, one feline and two birds. Samples analyzed included blood, gastric contents and baits. A control group which consisted of 18 healthy adult canines was used to obtain reference values for basal butyrylcholinesterase activity. Plasma butyrylcholinesterase levels were determined using a spectrophotometry method at 405 nm. Thin layer chromatography technique was performed with silicagel plates. Organophosphates and carbamates commercial formulations were used as standards. Aldicarb was identified in a canine and carbofuran was identified in a canine and two birds. In our country the used of these pesticides is restricted. It was confirmed that both, thin layer chromatography and butyrylcholinesterase activity determination are accessible methods, that do not need a special infrastructure, and can be easily adopted by low complexity laboratories. An up-to-date record of the most commonly used pesticides should be promoted and the confection of an epidemiological record of intoxicated animals should be encouraged.

INTRODUCCIÓN

La problemática de los animales intoxicados

La intoxicación de mascotas con plaguicidas es un evento común en la clínica veterinaria; la ausencia de denuncia obligatoria profesional y, por lo tanto, registros epidemiológicos actualizados lleva a una desinformación acerca de los tóxicos más frecuentemente utilizados, el daño que se produce en el medio ambiente y la salud pública. Internacionalmente, la casuística de mortandad de animales domésticos y silvestres debido a plaguicidas es elevada; y los distintos autores consideran a los animales domésticos como perros y gatos buenos centinelas del uso de venenos en el medio natural (Ferré, Saldeña, Albarracín, Neuilly y Gorla, 2015; Guitart, Croubels, et al., 2010; Sánchez-Barbudo, Camarero y Mateo, 2012).

Gupta (2012) afirma: “Los organofosforados (OP) y los carbamatos (CB) son comúnmente utilizados como pesticidas en agricultura, industrias y en los alrededores de casas y jardines. Además, algunos de estos ingredientes activos son utilizados como antiparasitarios en Medicina Veterinaria”. (p. 573)

Según estudios realizados, de las sospechas de intoxicaciones los pesticidas son los responsables del 37,3% de los casos, siendo los caninos la especie más afectada (71,1-75%), seguido por los felinos (15-15,8%), mientras que los restantes (10-13,1%) son equinos, animales de consumo, exóticos y silvestres (Caloni, Cortinovia, Rivolta, y Davanzo, 2016; Gwaltney-Brant, 2016).

Estos compuestos son elegidos con fines maliciosos, ya que se conoce ampliamente su efectividad como tóxicos y su eficacia letal (Gwaltney-Brant, 2016). De acuerdo con de Siqueira et al. (2015), estas sustancias son mezcladas con alimento balanceado, carne, pescado, facilitando el consumo por la especie a la que se trata de dañar, usando, generalmente, una sola dosis letal.

A pesar de que los resultados de laboratorio no son obtenidos inmediatamente, y el animal afectado no se ve directamente beneficiado,

identificar el agente causal permite cuantificar la magnitud del problema y advertir a los pobladores y veterinarios locales para proteger a otros animales, humanos y al ambiente (Ferré et al., 2015).

“La intoxicación intencional y accidental de animales y personas es una amenaza para la salud pública y la seguridad en todo el mundo”. (de Siqueira et al., 2015, p. 1). A pesar de ser un problema global, la intoxicación aguda por pesticidas en países en desarrollo es muy importante, ya que, a pesar de usar sólo el 20% de agroquímicos del mundo, sufren el 99% de las muertes por intoxicación con estos compuestos. Esto es debido a una reglamentación deficiente o ausente, falta de sistemas de vigilancia y de capacitación, entre otras deficiencias (González Vides, 2011; Marrs, 2012).

Marrs (2012) resalta también la falta de selectividad de estos pesticidas y su alta toxicidad, representando una seria amenaza para el medio ambiente, la salud de los seres humanos, animales domésticos, fauna silvestre y especies acuáticas.

Fisiología de la neurotransmisión colinérgica

La acetilcolina (ACh) se forma a partir de ácido acético, proveniente de la acetil coenzima A (acetil CoA) y la colina. Esta reacción está catalizada en el citosol de la terminal pre-sináptica por la enzima colina acetiltransferasa (Zuccolilli, 2002).

En la figura 1 se ilustra cómo en las terminales colinérgicas el neurotransmisor sintetizado puede ser liberado directamente al espacio sináptico, o bien, ser transportada al interior de las vesículas sinápticas para ser liberado por exocitosis en respuesta al incremento citosólico de calcio cuando un potencial de acción alcanza la terminal nerviosa (Flores Soto y Segura Torres, 2005; Zuccolilli, 2002).

Los receptores muscarínicos están presentes en diversos órganos y tejidos en la periferia (tejido cardíaco, músculo liso y glándulas exócrinas) y dentro del sistema nervioso central (SNC). En el cerebro, estos receptores están presentes en terminales sinápticas, regulando la liberación de neurotransmisores. Son proteínas integrales de membrana, en cuyos extremos extracelulares contienen el sitio activo para la ACh, y los extremos

intracelulares están acoplados a un sistema de Proteína G (receptores metabotrópicos). La activación de este receptor produce diferentes efectos según la cascada de enzimas que active y la célula post-sináptica que intervenga, como por ejemplo secreción gástrica, aumento de la motilidad gastrointestinal, excitación en el SNC (M1), disminución en la actividad cardíaca, inhibición en el SNC (M2), secreción glandular, contracción del músculo liso (M3) (Flores Soto y Segura Torres, 2005; Hill, Wyse y Anderson, 2006; Zuccolilli, 2002).

Los receptores nicotínicos son ionotrópicos y están presentes en la unión neuromuscular y en ganglios del sistema autónomo, aquí la función de la ACh es aumentar la permeabilidad de la membrana post-sináptica, principalmente para el sodio, lo que determina la despolarización de la célula, desencadenando el potencial de acción que se propaga llevando a la contracción de la fibra muscular (Hill et al., 2006; Zuccolilli, 2002).

La acción del neurotransmisor en la mayoría de las sinapsis finaliza cuando se produce su degradación enzimática o su recaptación. Se han descrito numerosos tipos de colinesterasas, y cada una posee una actividad hidrolítica diferente según el sustrato, así como una localización tisular diferente. Existe una colinesterasa verdadera o acetilcolinesterasa (AChE) presente principalmente en los tejidos nerviosos y eritrocitos, y una pseudocolinesterasa o butirilcolinesterasa (BChE), sintetizada en el hígado, presente en una amplia variedad de órganos como plasma, hígado, corazón, mucosa intestinal, páncreas, bazo, entre otros (Furlanello et al., 2006; Hill et al., 2006; Pineda, 2007; Zuccolilli, 2002). “En perros la actividad colinesterasa en la sangre se encuentra distribuida en un 50- 60 % en los eritrocitos (AChE) y 40-50 % en el plasma (BChE)”. (Maia, López y Rodríguez, 2012, p.135)

La AChE, ubicada dentro de la hendidura sináptica en la membrana post-sináptica, destruye la ACh formando dos productos: la colina y el acetato. Un transportador específico de colina recupera esta sustancia hacia la terminal pre-sináptica para volver a sintetizar ACh (Hill et al., 2006).

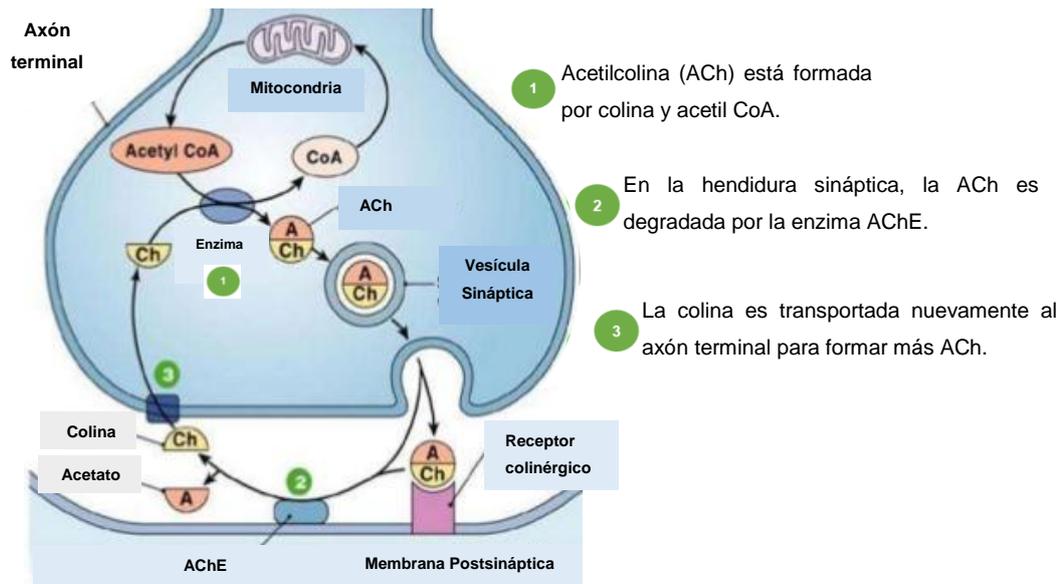


Figura 1: Biosíntesis de Acetilcolina. Adaptado de Soplin Almeida, 2013. ACh: acetilcolina, acetil CoA: acetil coenzima A, AChE: acetilcolinesterasa.

La inhibición de la colinesterasa produce: vómitos, salivación, disnea y diarrea (Peterson y Talcott, 2006). Las intoxicaciones de caninos por CB y OP son diagnosticadas de acuerdo a la sintomatología que presenten. Sin embargo, los signos se presentan cuando la depleción de la actividad colinesterasa en sangre suele deprimirse en más del 50% (Peterson y Talcott, 2006). En general, la información que se obtiene de la bibliografía revela diferencias considerables en la actividad colinesterasa. Las actividades son modificadas por pequeñas alteraciones por lo que la actividad enzimática puede diferir entre animales con resultados diferentes entre estudios. La variabilidad biológica entre individuos y los factores ambientales han sido sugeridas como factores que pueden interferir con la interpretación exacta de la actividad AChE. En invertebrados, la temperatura emerge como el factor más importante que controla los niveles de la actividad e inhibición de la acetilcolinesterasa. Sin embargo utilizando muestras controles, las cuales han tenido temperaturas ambientales similares, se puede eliminar esta fuente de variabilidad (Hyne y Maher, 2003). Por otro lado, los procedimientos analíticos y las temperaturas a la cual son medidas las enzimas, también influyen los resultados. Esta información es en general pobremente descriptos por lo que es difícil comparar los resultados. La variabilidad de la medición de las actividades de

enzimas colinesterasas entre laboratorios ha mostrado un CV mayor a un 20% en una misma serie de muestras. Los posibles cambios y modificaciones de los parámetros de medición son fuente de variación analítica, cuyo conocimiento y control tienen gran importancia para mejorar la calidad y precisión de los resultados, así como para permitir la realización de comparaciones entre laboratorios distintos (Tecles y Cerón, 2003).

Pesticidas

De acuerdo a la FAO, un plaguicida es:

Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte. (FAO, s/f, s/p)

Pórfido (2014) clasifica a los plaguicidas según su uso en insecticidas, herbicidas y fungicidas. Entre los primeros, aquellos cuyo modo de acción es la interferencia del sistema nervioso incluyen a organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, piretrinas, entre otros.

“En Argentina, el mercado de los plaguicidas alcanzó los 1308 millones de dólares en 2009, de los cuales el 63% correspondió a herbicidas, el 20% a insecticidas y el 9% a fungicidas”. (Bedmar, 2011, p. 11). La cipermetrina, clorpirifos y endosulfán son los insecticidas vendidos en mayor cantidad en la Argentina (Jergentz, Mugni, Bonetto y Schulz, 2005).

Clasificación toxicológica de los pesticidas

OMS

La Organización Mundial de la Salud utiliza las categorías de riesgo de toxicidad aguda del Sistema Mundialmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos, con aceptación mundial tras una extensa consulta internacional. Así, teniendo en cuenta la DL₅₀ en ratas, los pesticidas son clasificados en:

Ia: Extremadamente peligrosos. DL50: <5mg/kg sólido vía oral (VO).

Ib: Altamente peligrosos. DL50: 5-50mg/kg sólido VO.

II: Moderadamente peligrosos. DL50: 50-500 mg/kg sólido VO.

III: Levemente peligrosos. DL50: >500 mg/kg sólido VO.

U: No es probable que presente peligro agudo. DL50: >2000mg/kg sólido VO. (WHO, 2010)

PAN

La Red de Acción de Pesticidas (PAN International | Pesticide Action Network, s. f.) se define como: una red de organizaciones, instituciones, asociaciones e individuos que se oponen al uso masivo e indiscriminado de plaguicidas. Fomenta alternativas viables para el desarrollo de una agricultura, socialmente justa, ecológicamente sustentable y económicamente viable, que permita alcanzar la soberanía alimentaria de los pueblos. (s/p)

La PAN crea una clasificación de acuerdo a la toxicidad aguda de los tóxicos comparándolos con clasificaciones de otros organismos:

Extremadamente tóxico= WHO Ia.

Altamente tóxico= WHO Ib.

Moderadamente tóxico= WHO II.

Levemente tóxico= WHO III.

Sin toxicidad aguda= WHO U.

IARC

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, s. f.) ha producido monografías en las que se analiza la potencial carcinogenicidad de una amplia variedad de agentes físicos, químicos y biológicos. Según su potencial carcinogénico, son clasificados en:

Grupo 1: Carcinogénico para humanos,

Grupo 2A: Probablemente carcinogénico para humanos,

Grupo 2B: Posiblemente carcinogénico para humanos,

Grupo 3: No clasificable como carcinogénico para humanos, y

Grupo 4: Probablemente no carcinogénico para humanos.

SENASA

En la República Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) es la autoridad que regula la clasificación y etiquetado de los productos fitosanitarios. Con la Resolución SAGPyA 350/1999 se estableció la clasificación toxicológica de los productos de acuerdo al tipo de formulación y a las características de los productos formulados, tomando en consideración diferentes estudios toxicológicos.

Luego publica la Resolución SENASA N° 302/2012, donde modifican los criterios de la OMS para hacer su propia clasificación:

De acuerdo a la toxicidad aguda oral y dermal:

Ia: Extremadamente peligroso

Ib: Altamente peligroso

II: Moderadamente peligroso

III: Ligeramente peligroso

IV: Productos que normalmente no presentan peligro en el uso

De acuerdo a la toxicidad inhalatoria

I: Muy tóxico

II: Nocivo

III: Cuidado

De acuerdo a la irritación dermal e irritación ocular

I: Corrosivo

II: Severo Irritante

III: Moderado Irritante

IV: Leve Irritante

De acuerdo a la sensibilización cutánea

I: Sensibilizante

II: No sensibilizante (Pina, 2012)

Pesticidas Inhibidores de la Acetilcolinesterasa

Estos compuestos inhiben la AChE provocando la acumulación de ACh en los receptores colinérgicos; por lo tanto, producen efectos equivalentes a una excesiva estimulación de los receptores colinérgicos en toda la extensión del sistema nervioso (central y periférico) (Monteagudo Jimenez, 2002).

Se clasifican en: a) inhibidores reversibles o de corta duración (carbamatos) y b) inhibidores irreversibles o de larga duración (compuestos organofosforados) (Monteagudo Jimenez, 2002).

Organofosforados

Los organofosforados son ésteres orgánicos del ácido fosfórico y sus derivados (Román et al., 2000). Son ampliamente utilizados en todo el mundo, ya que son altamente efectivos, y la persistencia en el ambiente es relativamente baja (Badii y Varela, 2015).

La acción tóxica consiste en enlazarse de forma covalente con la AChE, inhibiendo su actividad enzimática normal, dando como resultado la acumulación excesiva de ACh y, en consecuencia, una estimulación sostenida de los órganos efectores colinérgicos (Badii et al., 2015).

El grado de defosforilación es extremadamente lento, por lo cual es considerado un inhibidor irreversible, siendo la recuperación de la actividad del 1% por día (Ecobichon, 2001; Pineda, 2007). Cuando la exposición al tóxico termina, la actividad colinesterásica tiende a normalizarse en cinco o seis semanas, según su síntesis en el hígado; tomando cuatro meses según los eritrocitos sean reemplazados (Silk, King y Whittaker, 1979).

Estos compuestos son muy liposolubles, se absorben fácilmente a través de la piel, con amplia distribución tisular, especialmente en el tejido adiposo. Se metabolizan en el hígado por oxidación y son eliminados principalmente por la orina (Muñoz Cobeñas, 2002).

Algunos ejemplos de OP son: Dimetoato (WHO: II), Clorpirifos (WHO: II), Malation (WHO: III, IARC: 2A), Paration (WHO: Ia, IARC: 2B).

Carbamatos

Son compuestos derivados del ácido carbámico. Son de pobre absorción por piel, por lo que es usado en aplicaciones tópicas. Se metabolizan rápidamente por esterasas plasmáticas y hepáticas y son eliminados principalmente por orina (Muñoz Cobeñas, 2002).

Tienen una unión débil con la AChE, la tasa de descarbamilación es suficientemente rápida para que estos ésteres se consideren inhibidores reversibles, por lo que su efecto puede ser de minutos o pocas horas, pudiendo llegar a la rápida recuperación al cesar la exposición (Pineda, 2007).

Ejemplos de esta categoría son: Aldicarb (WHO: Ia, IARC: 3), Carbaryl (WHO: II, IARC: 3), Carbofuran (WHO: Ib, IARC: 3), entre otros.

Intoxicación por plaguicidas anticolinesterásicos

El SNC de los insectos está muy desarrollado, mientras que el Sistema Nervioso Periférico no es tan complejo como el de los mamíferos, sin embargo, hay similitudes (Ecobichon, 2001). Sus componentes bioquímicos son similares, pero la diferencia en la localización permite una acción tóxica de los plaguicidas más selectiva. El SNC es colinérgico, mientras que la unión neuromuscular utiliza los neurotransmisores glutamato

y GABA, por lo que los plaguicidas anticolinesterásicos sólo actúan a nivel del SNC. La relación filogenética de la AChE de los invertebrados y los vertebrados indica la diversificación ocurrida durante la evolución de la enzima, la especificidad entre insectos y la selectividad entre insectos y mamíferos varían considerablemente para los OP y CB debido a las diferencias entre especies en la estructura del sitio de acción, un solo cambio en la molécula del plaguicida puede conferirle selectividad, reduciendo la potencia en mamíferos pero no en insectos (Casida y Durkin, 2013). Sin embargo, dado que el sitio y/o modo de acción son similares, un producto químico que actúa en el SNC de un insecto tendrá efectos similares en especies superiores; por lo tanto, sólo la dosis, tanto en cantidad como tiempo de exposición, determinará la intensidad de los efectos en las especies no específicas.

Las circunstancias que llevan a una exposición letal pueden ser clasificadas en:

- Accidente, con uso aprobado: el envenenamiento se produce cuando los pesticidas se aplican adecuadamente.
- Mal uso: los pesticidas no se aplican de acuerdo con las condiciones de uso especificadas.
- Abuso deliberado: intento de envenenamiento de animales (Martínez-Haro et al., 2008).

La intoxicación aguda puede causar envenenamiento de severidad variable y es potencialmente letal; es de corto tiempo, limitado geográficamente, y en general asociado a un solo tipo de pesticida. Los efectos crónicos pueden presentarse luego de un período latente de una exposición a altas dosis, a una exposición de moderada a alta en dosis repetidas, o una exposición anual a bajos niveles por décadas; los daños pueden ser irreversibles, varios estudios la asocian con cáncer, déficits neurológicos, disrupción endócrina, desórdenes inmunológicos, defectos de nacimiento, problemas de fertilidad y reproductivos (Butinof et al., 2015; Ecobichon, 2001).

La vía de entrada de los plaguicidas más común es la digestiva, seguida por las vías respiratorias y piel, y, por último, las menos comunes, la vía ocular, intramamaria e inyecciones parenterales (Gwaltney-Brant, 2016).

La depresión de las colinesterasas comienza, por lo general, inmediatamente después de producirse una absorción significativa de los inhibidores, o dentro de las 24 horas siguientes, hasta dos días después. La severidad y curso de la intoxicación dependerá de la dosis y vía de entrada (Ferré et al., 2015; Tiwari y Sinha, 2010).

Los signos muscarínicos son, en general, los primeros en aparecer, e incluyen hipersalivación, disnea debido a un aumento de las secreciones traqueobronquiales, bronco y laringoespasmos, espasmos gastrointestinales, lagrimeo, dacriorrea, vómitos, sudoración excesiva, poliuria, diarrea, miosis y bradicardia. Los principales signos nicotínicos incluyen fasciculaciones musculares, temblores, debilidad muscular, parálisis flácida, vómitos y parálisis de los músculos respiratorios. A dosis elevadas aparecen signos del SNC y puede incluir inquietud, temblores, convulsiones parciales o generalizadas, alteración mental, ataxia, cianosis y coma. Finalmente, la muerte puede producirse por un paro cardíaco e insuficiencia respiratoria (Marrs, 2012; Tiwari y Sinha, 2010).

Luego de la recuperación de la intoxicación aguda con OP, algunos signos persisten por meses o más. Otra manifestación de la exposición a OP es una condición paralítica llamada síndrome intermedio, cuya incidencia es del 57,1%, y que consiste en una secuencia de signos neurológicos que aparecen 24 a 96hs luego de la crisis colinérgica; este síndrome está compuesto por debilidad muscular, que afecta primero a los músculos inervados por los nervios craneales (flexores del cuello, músculos respiratorios) y los de los miembros. La urgencia se presenta por el distress respiratorio, que puede requerir ventilación artificial. Este síndrome se presenta en pacientes con inhibición prolongada de la AChE (Ecobichon, 2001; Fernández, Mancipe y Fernández, 2010).

La tercera manifestación de la exposición a OP consiste en la neurotoxicidad retardada, se trata de una polineuropatía motora y sensorial,

afecta a las extremidades, y se manifiesta con debilidad ascendente, ataxia, hipotrofia muscular, hiporreflexia en miembros posteriores, parestesias, dolor neuropático e hipoestesia. Los OP inhiben una esterasa neurotóxica localizada en el cerebro y médula espinal; las lesiones asociadas son desmielinización de los tractos motores centrales y periféricos. Los signos se presentan entre los 8 a 21 días después de la exposición, y no tiene antídoto específico. La recuperación puede ser total o parcial entre seis a doce meses con rehabilitación (Fernández et al., 2010; Tiwari y Sinha, 2010).

Los signos de una intoxicación aguda por CB son similares a los descritos para los OP, la única diferencia es la duración e intensidad de la toxicidad (Ecobichon, 2001). Los signos más comunes que encontraron Anastasio y Sharp (2011) son vómitos, ptialismo, diarrea y tremores. Estos autores lo representan con el acrónimo "SLUDGE": salivación, lagrimeo, poliuria (urination), diarrea, cólicos (gastric cramping) y emesis. Debido a que los CB no atraviesan la barrera hematoencefálica con facilidad, los signos del SNC son limitados. Las intoxicaciones por CB no presentan síndrome intermedio ni neuropatía retardada, debido a que la inhibición de colinesterasa es reversible (Ecobichon, 2001; Ferré et al., 2015).

Intoxicación con plaguicidas anticolinesterásicos - Diagnóstico diferencial

Los signos asociados con la intoxicación con pesticidas deben diferenciarse de otras patologías como: intoxicación con hidrocarburos clorados, nicotina, fenotiazinas, opiáceos y hongos; neurotoxinas de arañas, escorpiones, víboras; enfermedades infecciosas como botulismo, leptospirosis, encefalitis, meningitis; enfermedades neurológicas como epilepsia, vasculitis cerebral, hemorragia o hematoma subaracnoideo o subdural; y enfermedades metabólicas como azotemia, hipo o hiperglucemia, mixedema, coma y crisis tirotóxica, insuficiencia cardíaca congestiva (Anastasio y Sharp, 2011; Ferré et al., 2015). De acuerdo con Bardin, Eeden, Moolman, Foden y Joubert, (1994), la medición de la actividad sérica de la pseudocolinesterasa es la técnica más valiosa para evaluar la supuesta intoxicación. Sin embargo, se espera una actividad disminuida en enfermedades hepáticas, malnutrición, dermatomiositis, envenenamiento con disulfuro de carbono y mercurio orgánico.

Cuando el tiempo transcurrido entre la exposición hasta la aparición de los signos clínicos es corto, de minutos a pocas horas, la mejor muestra a tomar es en el sitio de entrada, donde la concentración del tóxico es elevada. A medida que es absorbido, las concentraciones sanguíneas aumentan, haciendo de la sangre la muestra más importante (Gwaltney-Brant, 2016). Algunas de las muestras que pueden usarse para la identificación de anticolinesterásicos son cerebro, retina, sangre, pelo, comida, plantas, agua y suelo (Gwaltney-Brant, 2016). Anastasio y Sharp (2011) en su revisión de casos, encontraron restos de toxinas en el vómito (62,5%), en el fluido gástrico (83%) y en enemas (47%).

Tratamiento

El tratamiento es, en general, sintomático y de soporte. Si la exposición fue dérmica, debe lavarse la piel en la zona de contacto con agua y detergente a temperatura ambiente, pero sin refregar ni irritarla. Si la intoxicación es reciente (menos de 2 horas) y el paciente es asintomático, puede inducirse el vómito, o realizar un lavado gástrico. La administración de carbón activado limita la absorción de las toxinas a una dosis de 1-4 g/kg vía oral, se debe administrar un catártico salino después de media hora, dado que el carbón activado se estaciona en el tracto gastrointestinal liberando lentamente la toxina adsorbida. La administración de fluidos intravenosos además de usarse para la rehidratación, la repleción del volumen intravascular, mantenimiento, también favorece a la diuresis, lo que incrementa la excreción renal de las toxinas (Anastasio y Sharp, 2011; Tiwari y Sinha, 2010; Verster, Botha, Naidoo y Van Schalkwyk, 2004).

Todos los casos de intoxicación con inhibidores de acetilcolinesterasa deben ser tratados como una emergencia y ser hospitalizados lo antes posible, controlando los signos vitales. Los parasimpaticolíticos como la atropina, son usados para contrarrestar sólo los efectos muscarínicos iniciales, ya que no tiene efectos sobre los receptores nicotínicos; inicialmente la respuesta es buena, sin embargo, disminuye en cada repetición. La dosis recomendada es de 0,2 - 0,5 mg/kg (Anastasio y Sharp, 2011). La atropinización es adecuada cuando hay midriasis, cesa la salivación y el animal se encuentra alerta. En intoxicaciones moderadas a

severas con OP, el tratamiento suplementario para compensar los signos nicotínicos y del SNC es con oximas (Pralidoxima) endovenosas para reactivar el tejido nervioso inhibido, lo cual debe instaurarse de inmediato, ya que mientras mayor es el intervalo entre la exposición y el tratamiento, son menos efectivas; generalmente sólo se necesita una dosis para contrarrestar los signos y reducir la dosis de atropina, aunque en intoxicaciones severas son necesarias varias dosis. Hay que tener en cuenta que la pralidoxima se une a los iones de calcio, pudiendo producir espasmos musculares similares a los dados por la misma intoxicación (Anastasio y Sharp, 2011; Ecobichon, 2001; Tiwari y Sinha, 2010; Verster et al., 2004).

Verster et al. (2004) describen el uso de difenhidramina en dosis de 1-5 mg/kg vía oral cada 6-8hs para revertir los efectos nicotínicos.

Las oximas están contraindicadas en las intoxicaciones con CB (Ecobichon, 2001).

Las fasciculaciones musculares, temblores y convulsiones causan, en algunos casos, hipertermia e hiperlactemia, lo que lleva a una acidosis láctica. El diazepam se incluye en el tratamiento de ambas intoxicaciones para contrarrestar estos efectos del SNC y neuromusculares que no se inhibieron con la atropina (Anastasio y Sharp, 2011; Ecobichon, 2001).

El uso de ventilación mecánica y administración de oxígeno debe considerarse ante la presencia de parálisis de los músculos respiratorios debido al agotamiento producido por la sobreestimulación nicotínica, aunque Anastasio y Sharp (2011) esperan más estudios para confirmar esta hipótesis; a pesar de esto recomiendan un monitoreo de al menos 18-24hs por si se presenta esta falla.

Plaguicidas que actúan a través de otros mecanismos

El endosulfan, un compuesto organoclorado del grupo ciclodieno, prohibido en la actualidad por ser altamente tóxico y persistente en el ambiente, sigue siendo usado en países en desarrollo por ser efectivo y económico. Estos compuestos poseen baja volatilidad, estabilidad química, solubilidad lipídica, baja tasa de biotransformación y degradación, lo que los hacen muy eficaces como insecticida, pero también los hacen persistentes

en el medio ambiente, induciendo su bioconcentración y biomagnificación en la cadena alimentaria. Tienen propiedades enzimáticas y/o estrogénicas, con interferencia en la fertilidad y reproducción. Se absorben eficientemente por piel; y los signos son el resultado de su antagonismo con los receptores GABA, de la inhibición de las bombas de membrana Na^+/K^+ y $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$, presentando signos a nivel del SNC como convulsiones, temblores, episodios de hiperactividad intercalados con funciones normales (Ecobichon, 2001).

Los insecticidas piretroides sintéticos son componentes de “sprays” domésticos, de plantas, pulguicidas para las mascotas, entre otras aplicaciones. Su mecanismo de acción consiste en la activación y/o inactivación de los canales de Na^+/K^+ , lo que resulta en un estado de hiperexcitabilidad en distintas regiones del sistema nervioso, los canales de sodio de los insectos son 100 veces más sensibles a estos ésteres; otro sitio de acción son los canales de calcio, donde los de los mamíferos son menos sensibles. Constituyen un peligro para el medio ambiente debido a su alto nivel hidrofóbico y por poseer una estructura similar al diclorodifeniltricloroetano (DDT) (organoclorados). Estas características sumado a su uso conjunto con endosulfán, han llevado a considerarlos objetivos de los estudios de contaminación del suelo (Ecobichon, 2001; Gonzalez, Miglioranza, Aizpún, Isla y Peña, 2010). Dentro de este grupo, es importante resaltar el amplio uso de Cipermetrina (WHO: II) en la medicina veterinaria y la desinfección.

Análisis para la determinación de plaguicidas en laboratorios de baja complejidad

Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía es usada para la detección de drogas, pesticidas y otros tóxicos orgánicos. Permite la separación de los compuestos basándose en sus propiedades químicas y, luego, detectados mediante su absorción de luz UV, fluorescencia, oxidación/ reducción, transferencia de electrones y peso. La cromatografía en placa fina (CCF) separa los compuestos en una matriz sólida (Gwaltney-Brant, 2016).

La cromatografía en placa delgada (o capa fina) es un método ampliamente utilizado, relativamente barato y sencillo de realizar y requiere de una infraestructura mínima. Puede ser un poderoso método separativo y permite al mismo tiempo un análisis cualitativo (Flanagan, Braithwaite, Brown, Widdop y de Wolff, 1995).

La Fase Estacionaria (FE) está compuesta por un soporte de vidrio, aluminio o plástico, el cual debe ser inerte con las sustancias a analizar; tiene un agregado de yeso (CaCO_3) o almidón que permite que se adhiera el adsorbente, los más utilizados son los de sílica gel (SiO_2) y alúmina (Al_2O_3), son de carácter polar, y de espesor variable dependiendo si la placa es usada para la investigación analítica o preparativa. La alúmina es muy activa, se utiliza para separar compuestos apolares como hidrocarburos, éteres, aldehídos y cetonas, el sílice separa sustancias más polares como alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos (Chicharro, Bautista, Benayas, y Ortiz, s. f.; Flanagan et al., 1995).

La Fase Móvil (FM) o Eluyente está compuesta por uno o varios diluyentes mezclados. El grado de elución de un compuesto es mayor si la polaridad de la FM aumenta. En orden creciente de fuerza eluyente, los diluyentes más usados son: Hexano, tetraclorometano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, acetona, 2-propanol, metanol, agua. Las características de estos diluyentes es que tienen bajo punto de ebullición y viscosidad, lo que les permite moverse con rapidez (Flanagan et al., 1995; Hernán, Arias, Xavier, y Llanda, 2013).

El eluyente se mueve a través de la placa por fuerzas capilares, produciéndose la separación de los componentes de la muestra por competencia entre la FM y el soluto por los sitios activos polares de la FE, así, las moléculas ya adsorbidas en la placa, son desplazadas por el efecto de elución de la FM. La retención depende de la polaridad del compuesto y la naturaleza del disolvente. Según la primera, los solutos más polares quedarán más retenidos ya que se adsorben más firmemente a los centros activos, mientras que los no polares eluirán con más facilidad. Dependiendo de la segunda, para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad del

disolvente facilita su desplazamiento en la placa. El recorrido debe ser de 5 a 15 cm como máximo, y el tiempo necesario depende de la FE, de su espesor y la composición del eluyente (Chicharro et al., s. f.; Flanagan et al., 1995; Hernán et al., 2013).

Algunas placas tienen indicador de fluorescencia que se revela con luz ultravioleta (254 nm), la presencia de un compuesto activo evita que el indicador absorba la luz dando como resultado una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto. Si no poseen este indicador, es necesario el uso de un revelador, el cual reacciona con los productos adsorbidos dando como resultado compuestos coloreados. (Chicharro et al., s. f.; Flanagan et al., 1995).

La relación entre las distancias recorridas por el eluyente y el soluto se conoce como factor de retención, y se calcula como la distancia recorrida por el compuesto/distancia recorrida por el eluyente, tomando valores entre 0 y 1; tiene un valor constante para cada compuesto en condiciones determinadas como el adsorbente utilizado, el diluyente, tamaño de la cuba, temperatura, etc. Ya que es imposible recrear las mismas condiciones entre dos determinaciones distintas, los distintos autores recomiendan realizar comparaciones de distintas muestras en una misma placa (Chicharro et al., s. f.; Flanagan et al., 1995; Spangenberg, Poole y Weins, 2011).

Medición de la Butirilcolinesterasa

El método de Ellman y sus modificaciones son las técnicas más usadas en el mundo para medir la actividad colinesterásica en sangre en animales y humanos (Furlanello et al., 2006).

Esta técnica nos permite diferenciar una intoxicación entre OP y CB realizando al menos una segunda determinación 24hs después de la primera, observando si la actividad se mantiene en el mismo porcentaje (OP) o si ha aumentado (CB) (Ferré et al., 2015). El método se basa en la medición de los productos de la reacción, y sus ventajas son: simplicidad, alta precisión, pH constante, flexibilidad, cortos periodos de incubación, aumento continuo de la intensidad del color en función del tiempo, económico, no invasivo, no necesita equipos sofisticados, y es susceptible

de ser automatizado en el laboratorio (Silk et al., 1979; Tecles y Cerón, 2003).

Según Tecles y Cerón (2003):

La técnica espectrofotométrica, [...] se basa en la hidrólisis del sustrato acetilcolina por la enzima colinesterasa. La tiocolina liberada reacciona con un cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), dando lugar como producto de reacción al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, un compuesto de color amarillo cuyo máximo de absorbancia se encuentra entre 405 y 420 nm de longitud de onda. La tasa de aparición del producto aumenta conforme aumenta la actividad enzimática existente en la muestra. (p. 63)

Como clasifican estos mismos autores, los factores que influyen en los resultados pueden dividirse en: pre analíticos y analíticos. Entre los primeros se encuentran aquellos relacionados con el estado fisiológico de cada individuo, como la edad, sexo, estado reproductivo y salud, siendo los tres primeros los que más afectan a la colinesterasa plasmática que a la eritrocitaria. Otro factor es el glutatión presente cuando se produce la hemólisis, éste puede reaccionar con el cromóforo dando lugar a un falso positivo. El mantenimiento de la muestra a temperatura ambiente es adecuado si el análisis se realiza de inmediato, pero si necesita un almacenamiento prolongado la estabilidad de la colinesterasa se mantiene a -20°C (Tecles y Cerón, 2003).

Con respecto a las variaciones analíticas, se citan la temperatura de la reacción, la cual es óptima entre 37° y 40°C , sin embargo, si la colinesterasa está inhibida por un inhibidor reversible como los CB, la reacción a 37°C puede provocar la reactivación de la enzima, por lo que la determinación a 25°C debe ser de consideración. Con respecto al pH, los autores recomiendan la utilización de pH 7,5. Otra variación la presenta el uso de sangre entera, ya que la hemoglobina presenta una longitud de onda similar al producto de la reacción. El autor contempla que la BChE es más sensible a los OP que la AChE, además las especies caninas, felinas y equinas presentan una elevada actividad de esta enzima en plasma,

teniendo en cuenta además que su actividad se recupera antes que la AChE. Con respecto a la lectura, recomienda 4 ciclos separados de un tiempo entre 60 y 90 segundos (Tecles y Cerón, 2003).

Plaguicidas en el Medio Ambiente

Los animales que fallecen teniendo signos relacionados con intoxicación con plaguicidas deben considerarse peligrosos, asegurándose una correcta disposición de la carcasa, no deben ser recolectados por los servicios municipales, ni depositados en basurales, donde otros animales carroñeros pueden ingerirlos; siendo la incineración el mejor método para deshacerse del animal y proteger el ambiente y la salud de las personas y de otros animales (Verster et al., 2004).

Dado que sólo el 10% de los pesticidas llegan al organismo diana o blanco, un alto porcentaje se deposita en áreas no específicas (suelos, agua, sedimentos) pudiendo afectar la salud pública y a otros organismos en general (Butinof et al., 2015).

Muchos pesticidas pueden persistir por largos periodos en el ecosistema (De Gerónimo et al., 2014). En un estudio realizado por Jergentz et al. (2005), se detectó cipermetrina en las partículas en suspensión hasta siete semanas después de la aplicación en el campo y en el sedimento de escorrentía hasta ocho semanas después. La contaminación del agua puede acarrear efectos eco-toxicológicos para la flora y fauna acuática, además la presencia de pesticidas en el agua destinada a consumo humano conlleva a altos costos de tratamiento, posibles incidentes toxicológicos hasta la prohibición del uso del agua (De Gerónimo et al., 2014).

Por otro lado, se ha confirmado la presencia de clorpirifos en suelos, aguas superficiales y subterráneas en tres áreas diferentes del territorio (Etchegoyen, Ronco, Almada, Abelando y Marino, 2017; Loewy, Monza, Kirs y Savini, 2011; Marino, Rimoldi, Demetrio, Peluso y Ronco, 2014). Cabagna, Lajmanovich, Stringhini, Sanchez-Hernandez y Peltzer (2005) estudiaron los efectos de los pesticidas en *Bufo arenarum* en la provincia de Santa Fe, donde encontraron una disminución de leucocitos.

OBJETIVO

Realizar la identificación orientativa o confirmatoria de plaguicidas, principalmente en caninos, con signos de intoxicación por plaguicidas, utilizando técnicas analítica y bioquímica de fácil disponibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Animales controles

Este grupo estuvo formado por 18 caninos adultos sanos (12 hembras y 6 machos). Como criterio de inclusión se trabajó con animales sin historial de exposición a compuestos OP o CB. Se les tomó muestras de sangre para la obtención de valores de referencia de la actividad BChE en caninos adultos de la región.

Animales con signos de intoxicación

Este grupo estuvo formado por 5 caninos, 1 felino y 2 aves.

Como criterio de inclusión en este grupo se trabajó con animales con signos compatibles con intoxicación con inhibidores de colinesterasas, los que incluyen: aumento de la salivación, broncorrea, poliuria, lagrimeo, diarrea, cólicos, emesis, miosis, bradicardia, convulsiones, fasciculaciones, ataxia, coma.

El caso n° 1 es recibido en una veterinaria en el mes de agosto con signos clínicos compatibles con una intoxicación con inhibidores de colinesterasas. El animal fue estabilizado con tratamiento sintomático, fluidoterapia y sulfato de atropina. En la anamnesis los dueños relatan que la intoxicación ocurrió en forma accidental ya que los propietarios del canino habían colocado en el hogar un rodenticida al cual el perro tuvo acceso.

El caso n° 2 se presentó con convulsiones, vómitos y fasciculaciones, los cuales concuerdan con la intoxicación con CB u OP. En la anamnesis los propietarios no relacionaron el evento con la colocación de algún plaguicida por su parte.

El caso n° 3 y 4 fueron animales que convivían en el mismo domicilio con el hábito de salir a la calle sin ser vigilados por sus dueños y permanecer afuera durante periodos variables de tiempo. En este mismo período de tiempo, mes de Noviembre de 2016, en esta misma zona de El Bermejo, Guaymallén, vecinos denunciaron 15 animales muertos con sintomatología de intoxicación por agentes anticolinesterásicos, existiendo

una denuncia policial en la Unidad Fiscal n° 9, Expediente n° P-110657/16. Algunos de ellos poseían dueños, otros eran animales comunitarios.

El caso n° 5 fue un animal que no poseía dueño, un vecino de la zona lo acercó a la veterinaria debido a que lo encontró en la vía pública en malas condiciones de salud.

El animal del caso n° 6 fue similar al caso n° 2 el cual los vecinos intuyeron que fue un episodio de intoxicación con fines delictivos. Fue atendido medicamente en una veterinaria privada respondiendo favorablemente al tratamiento específico para CB y/o OP.

El caso n° 7 corresponde al hallazgo de aves muertas en la vía pública. Dos torcacitas (*Columbina picui*) que fueron encontradas en zona rural de Maipú posterior a una fumigación de cultivos en el mes de octubre con carbosulfan (información brindada por los propietarios de la finca).

Los animales incluidos en este estudio son caninos y felinos, los cuales se presentaron en clínicas veterinarias privadas, y aves recolectadas en un predio cercano a una vivienda. Todos los individuos fueron examinados por profesionales veterinarios y se completó la historia clínica de cada paciente.

Muestras biológicas

Sangre periférica

Se realizó una extracción de sangre venosa periférica con rigurosa asepsia, previo consentimiento del propietario, poniéndolos en conocimiento del estudio a realizar. Para la extracción de sangre se rasuró uno de los miembros torácicos de los animales, se limpió el lugar de punción con alcohol etílico al 96% y se procedió a la extracción de 1,5 – 2 ml de sangre en jeringa estéril con EDTA. Posteriormente, se realizó hemostasia en el sitio de punción hasta que se detuvo el sangrado. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 rpm y el sobrenadante se refrigeró a -4°C para los estudios enzimáticos (medición de BChE).

Contenido estomacal

El contenido gástrico fue recolectado a partir de los vómitos de los pacientes asistidos o a partir de necropsias de animales fallecidos. Las muestras de contenido estomacal fueron refrigeradas a -4°C hasta el momento de la determinación analítica.

El destino de las muestras fue el Laboratorio de Genética, Reproducción y Ambiente de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales. El procesamiento de las mismas se realizó bajo las normas del Manual de Bioseguridad producido por el Laboratorio Central, en vigencia.

El período de toma de muestras estuvo comprendido entre Julio de 2016 y Abril del 2017. Los animales intoxicados que participaron del estudio fueron trasladados por sus propietarios y asistidos por veterinarios en clínicas privadas. Los animales sin propietarios no pudieron recibir tratamiento sintomático, murieron y las muestras fueron tomadas por medio de necropsias en las instalaciones de la Universidad Juan Agustín Maza.

Los datos epidemiológicos registrados fueron: número de casos, especie, raza, sexo, edad (cachorro, adulto), tipos de agentes causales de la intoxicación, signos observados (compatible con intoxicación con OP o CB), evolución (muerto o vivo), lugar geográfico donde se detectó el caso.

Las muestras fueron refrigeradas y luego transportadas al laboratorio del GenAR ubicado en las instalaciones de la Universidad Juan Agustín Maza, donde se realizan las pruebas para determinar y confirmar el agente causal de la intoxicación.

Los análisis de CCF para identificar el agente causal de las intoxicaciones, a partir de los caninos y felinos estudiados y las diferentes matrices biológicas se presentan a continuación:

En el caso n°1 se realizó el análisis a partir del tóxico entregado por el propietario al grupo de investigación. Los propietarios identifican el producto como un rodenticida que ellos habían utilizado en el hogar.

En el caso n°3 se realizó la necropsia del animal, se obtuvo contenido gastroduodenal el cual posteriormente se analizó.

El felino del caso n°4 habitaba en el mismo domicilio que el animal anterior. Tras su muerte se realizó la necropsia y se obtuvo contenido gástrico e intestinal.

En el caso n°6, se realizó el análisis cromatográfico con la matriz biológica vómito.

Métodos

Cromatografía en Placa Fina

Para ésta determinación, la extracción de la sustancia a investigar se realizó mezclando 2ml de contenido gástrico con agua destilada, lo necesario según la viscosidad; se homogenizó y midió el pH, el cual debía estar en el rango de 3-4, usando, en los casos necesarios, gotas de solución saturada de ácido tartárico para acidificar la muestra. Luego se centrifugó y se usó el sobrenadante, que se volcó en una columna EXTrelut ®NT3 de 20ml; se dejó reposar por 15 minutos; y después se eluyó con 15ml de éter de petróleo/ éter etílico en una concentración de 50/ 50. El líquido eluído (eluato), se llevó a sequedad en estufa.

Para la separación e identificación con la técnica de CCF se usaron placas TLC Silicagel 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm (Merck®). Se marcó la zona de siembra en la placa cromatográfica utilizando lápiz, representada por una línea recta, a 2 cm del borde inferior (por encima del nivel del solvente), con una "X" y la sigla correspondiente de las muestras y testigos a procesar.

El eluído se redisolvió con 0,5ml de acetona, y se sembraron sobre la placa testigos de plaguicidas OP (dimetoato y paration), y CB (aldicarb, carbaryl, carbofuran y carbosulfan) y el extracto de la muestra en estudio, usando micropipetas. Se colocó una gota, se evaporó el solvente en la estufa a 110°C, y se colocó una segunda gota en el mismo lugar para concentrar la muestra.

La FM se colocó en una cuba cerrada, de 15 x 15 x 6 cm, se saturó durante 15 min antes de introducir la placa para que el ascenso sea homogéneo, la cual consistió en el solvente de corrida cuádruple formado por n-hexano/ ciclohexano/ cloroformo/ acetona en una concentración de 40/ 40/ 10/ 10, mezcla recomendada por Flanagan et al., (1995), y se selló la

tapa con vaselina. Pasado este tiempo, se colocó la placa y se dejó correr el frente del solvente hasta 1cm antes del borde superior. En ese momento se retiró y se dejó secar sobre la placa calefactora.

El revelado secuencial se realizó pulverizando la placa con distintas soluciones, bajo campana de tiro forzado. Para la identificación de cualquier sustancia desconocida se utilizan varios reveladores, aumentando así la probabilidad de identificación. Las manchas pueden variar dependiendo de la concentración, presencia de otras sustancias eluidas, intensidad del revelado y tipo de placa utilizada (Chicharro et al., s. f.; Flanagan et al., 1995).

Para el revelado de OP se usó la solución de cloruro de paladio al 0,2% en CIH al 10%. El resultado se visualiza como manchas color amarillo limón, naranja o castaño bajo la luz UV.

Después, se pulverizó con K(OH) al 15% para alcalinizar la placa; luego de dejó secar.

Posteriormente se pulverizó con 4-Nitro benceno diazonio-tetra-fluoroborato en Dietilén glicol/ Alcohol absoluto (1/ 9) para el revelado de CB, dando una variedad de colores que van del naranja, al rojo, violeta y azul.

Se comparó la distancia recorrida (Rf) por la muestra y los testigos identificando la sustancia en la muestra en estudio cuando la distancia recorrida coincidió con la del testigo estándar conocido.

Testigos

Para las determinaciones en CCF. Se detallan los compuestos utilizados como testigos estándares y sus características toxicológicas:

1. Organofosforados

1.1. Dimetoato:

1.1.1. Clasificación WHO: Grupo II

1.1.2. Clasificación IARC: -

1.1.3. DL₅₀ en ratas: 387mg/kg VO

1.1.4. Marca comercial: GlacoXan D-Sist®, Punch Química S.A.

1.1.5. Formulación: concentrado emulsionable.

1.1.6. Composición: O,O-dimetil S-metilcarbamoilmetil fosforoditioato.

1.2. Paration:

1.2.1. Clasificación WHO: Grupo Ia

1.2.2. Clasificación: 2B

1.2.3. DL₅₀ en ratas: 2mg/kg VO

1.2.4. Marca comercial: Folidol M-72®

1.2.5. Formulación: concentrado emulsionable.

1.2.6. Composición: O,O-dimetil-O,4-nitrofenil fosforotioato.

2. Carbamatos

2.1. Aldicarb:

2.1.1. Clasificación WHO: Grupo Ia

2.1.2. Clasificación IARC: 3

2.1.3. DL₅₀ en ratas: 0,5mg/kg VO

2.1.4. Marca comercial: Temik 15 G®, Bayer CropScience S.A.

2.1.5. Formulación: Granulado

2.1.6. Composición: 2-metil-2-(metilo)propionaldehido-0-(metilcarbamoil) oxima (15% p/p: 150g/kg)

2.2. Carbaryl:

2.2.1. Clasificación WHO: II

2.2.2. Clasificación IARC: 3

2.2.3. DL₅₀ en ratas: 264mg/kg VO

2.2.4. Marca comercial: Sevin 85 S®, Bayer CropScience S.A.

2.2.5. Formulación: polvo.

2.2.6. Composición: carbaryl 85%.

2.3. Carbosulfan:

2.3.1. Clasificación WHO: II

2.3.2. Clasificación IARC: -

2.3.3. DL₅₀ en ratas: 42,7mg/kg VO

2.3.4. Marca comercial: Posse 25 EC®, FMC® Química S.A.

2.3.5. Formulación: Concentrado emulsionable.

2.3.6. Composición: 2,3 dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-(dibutilamino) tiometilcarbamato.

2.4. Carbofuran:

2.4.1. Clasificación WHO: Ib

- 2.4.2. Clasificación IARC: 3
- 2.4.3. DL50 en ratas: 7mg/kg VO
- 2.4.4. Marca comercial: Furafarm 48F®, Sharda Worldwide
- 2.4.5. Formulación: Suspensión concentrada
- 2.4.6. Composición: 2,3 dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-metilcarbamato.

Determinación de Butirilcolinesterasa

Se determinaron los niveles de BChE plasmática utilizando el kit Colinesterasa de GT Lab® código 131040, método cinético por espectrofotometría a 405 nm, pH 7.7 a 30°C, basado en el método diseñado originalmente por (Ellman et al., 1961).

La reacción utiliza la enzima de la muestra para hidrolizar el sustrato butiriltiocolina, formando butirato y tiocolina, la cual reacciona con el DTNB formando un compuesto con un máximo de absorbancia entre 405 a 420nm, a una velocidad proporcional a la actividad de la colinesterasa en la muestra (Furlanello et al., 2006; «Colinesterasa-GT Lab», s. f.).

En el kit, diseñado para medicina humana, se efectuó la reducción proporcional de los volúmenes, para economizar los análisis y hacer dos determinaciones por cada 3 ml de sustrato butiriltiocolina provisto en cada vial. Los resultados fueron expresados en UI/l.

Se colocó la cubeta en el espectrofotómetro a 30°C. Se preparó la pre-mezcla que consiste en la mezcla de 3ml del buffer en el vial del sustrato, y se atemperó a temperatura ambiente. Se colocó 1,5ml de esta pre-mezcla en la cubeta y se incubó por un minuto.

Luego se agregó 10µl de muestra a la pre-mezcla homogeneizando, se dejó incubar un minuto y se procedió a las lecturas, las cuales se realizaron automáticamente cada treinta segundos, siendo la última lectura a los noventa segundos.

Análisis estadístico

Para comparar las actividades colinesterasas de animales pertenecientes a los dos grupos estudiados: animales controles y animales

con signos de intoxicación por anticolinesterásicos. Se realizó el análisis de test de Student. Mediante el mismo test se compararon las actividades entre hembras y machos del grupo control. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0,05$.

Se planteó como hipótesis nula: la actividad de la BChE en plasma se encuentra disminuída en animales con signos de intoxicación con OP o CB. Mientras que la hipótesis alternativa fue: la actividad de la BChE en plasma no presenta cambios en animales con signos de intoxicación con OP o CB.

La otra comparación fue entre machos y hembras del grupo control, donde la hipótesis nula fue: no existe diferencia en la actividad de la BChE en plasma entre machos y hembras que no han estado expuestos a compuestos OP o CB. La hipótesis alternativa fue: existe diferencia en la actividad de la BChE en plasma entre machos y hembras que no han estado expuestos a compuestos OP o CB.

RESULTADOS

Los animales estudiados y características principales de los episodios de intoxicación se presentan en la tabla I.

C a s o	Especie	Raza	S e x o	Edad	Agente causal	Signos	Evolución	Lugar
1	Canina	pitbull	M	adulto	CB	compatible con OP/ CB	sobrevivió	Gllén.
2	Canina	ovejero alemán	M	adulto	ND	compatible con OP/ CB	sobrevivió	Gllén.
3	Canina	labrador	H	adulto	aldicarb (CB)	compatible con OP/ CB	murió	Gllén.
4	Felina	mestizo	H	adulto	ND	Sin referencias	murió	Gllén.
5	Canina	mestizo	M	adulto	ND	compatible con OP/ CB	sobrevivió	Gllén.
6	Canina	mestizo	H	adulto	carbofuran (CB)	compatible con OP/ CB	murió	Gllén.
7	aviar	torcacita (2)	N D	adulto	carbosulfan (CB)	Sin referencias	murió	Maipú

Tabla I: Descripción epidemiológica de los casos de animales intoxicados estudiados, Mendoza, Julio 2016 - Abril 2017.

H: hembra, M: Macho, ND: no definido, CB: carbamatos OP: organofosforados, Gllén: Guaymallén.

En el caso n°1 al realizar el revelado, no coincidió con ninguno de los testigos utilizados, aunque se puso en manifiesto con el revelador de carbamatos, por lo que se estima que pertenece al grupo CB, no logrando realizar la identificación exacta del agente causal.

En el caso n°3 el revelado determinó que el plaguicida involucrado fue aldicarb al coincidir con el testigo del mismo en cuanto su distancia de migración del lugar de siembra.

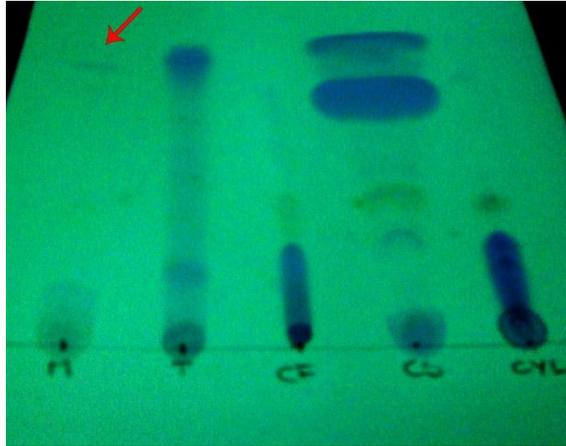


Figura 2: Foto de Placa cromatográfica TLC Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck®.

M: muestra. T: aldicarb, CF: carbofuran, CS: carbosulfan, CYL: carbaryl. Resultado de cromatografía en placa fina de un canino adulto hembra raza Labrador (caso n° 3 estudiado). La muestra fue contenido gastroduodenal. Se observa la identificación de aldicarb en la muestra analizada (flecha).

El felino del caso n°4 fue analizado de igual manera que el caso con el que co habitaba, sin embargo, el resultado fue negativo, no evidenciándose ningún tóxico.

En el caso n°6 se determinó que el plaguicida involucrado fue carbofuran.

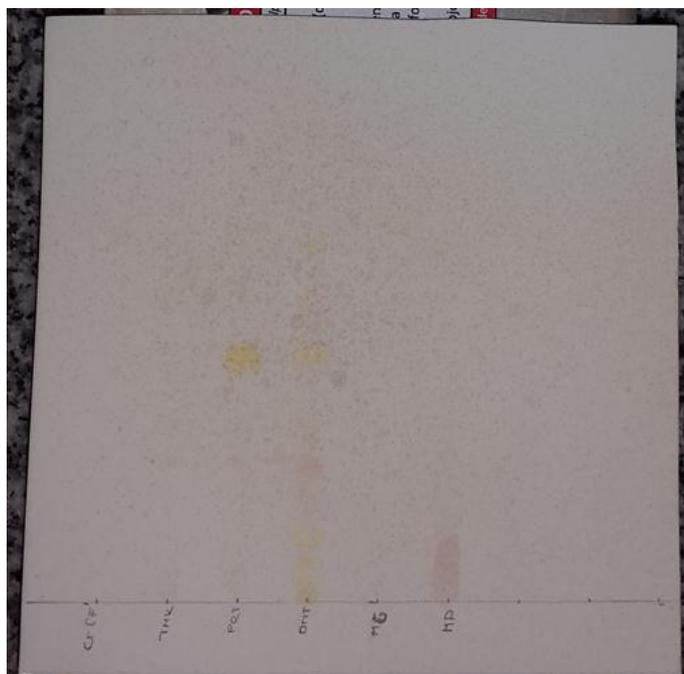


Figura 3: Foto de Placa cromatográfica TLC Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck® vaporizada con revelado específico para carbamatos.

CrCF: Carbofurán, TMK: Aldicarb, PRT: Paratión, DMT: Dimetoato. MG: Muestra gato (caso n°4); MP: Muestra perro (caso n°6).

Las actividades medias de BChE obtenidas en plasma canino de los grupos de caninos estudiados se presentan en la tabla II.

Muestra	Media ± DE (UI/l)	CV (%)	Tamaño de la muestra
Grupo control	4432,89 ± 1443,14	32,56	N=18 caninos (12 hembras y 6 machos)
Grupo con signos de intoxicación por OP y CB	1127,71 ± 859,64	76,23	N=5 (2 hembras y 3 machos)

Tabla II: Valores de actividad Butirilcolinesterasa en plasma de caninos de Mendoza. ***p<0,0001 entre animales controles y animales con signos de intoxicación. OP: organofosforado; CB: carbamato; DE: desvío estándar; UI: unidades internacionales; L: litro; CV: coeficiente de variación.

El análisis efectuado entre los caninos hembras y machos del grupo control no evidenció diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las medias de la actividad de BChE ($p= 0,2640$) como se ilustra en la figura 4.

La actividad de la BChE plasmática entre el grupo control y el grupo de animales con signos de intoxicación presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p<0,0001$). En la figura 5 puede observarse la variabilidad entre ambos grupos.

Valores de referencia de actividad BChE en plasma de caninos adultos

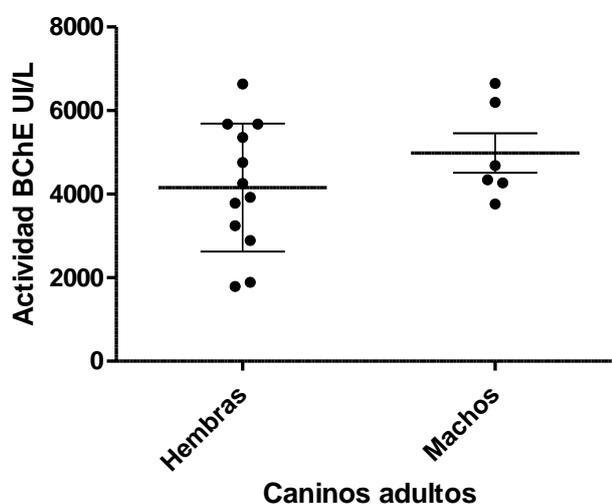


Figura 4: Distribución de valores de referencia de actividad BChE en caninos hembras y machos adultos de Mendoza. N=18 (12 hembras y 6 machos).

Dispersión de los valores de los grupos intoxicados y de control

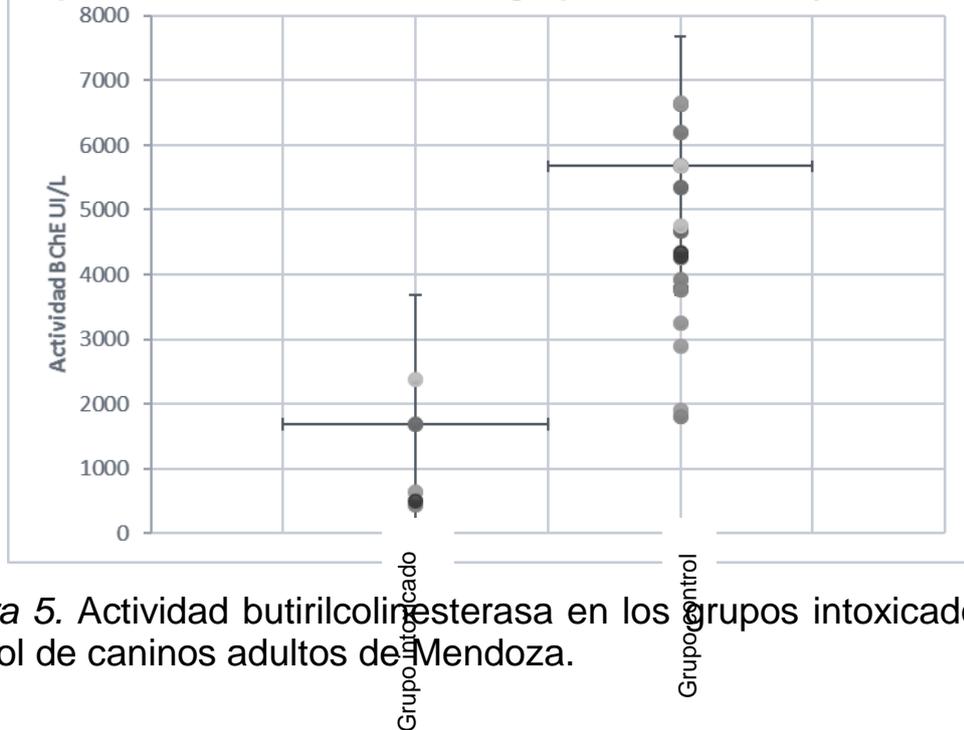


Figura 5. Actividad butirilcolinesterasa en los grupos intoxicado y control de caninos adultos de Mendoza.

DISCUSIÓN

Cinco de los siete casos estudiados presentaban signos de intoxicación por OP/ CB, en cuatro de ellos pudimos definir que el agente causal era un CB y en dos de estos casos se pudo identificar al tóxico que fueron aldicarb (caso n° 3) y carbofuran (caso n°6). En un tercer caso se detecta la presencia de un CB, aunque no puede especificarse cuál es por no disponer de otros testigos o estándares (caso n° 1).

En nuestro país, el uso de los CB aldicarb y carbofuran está restringido, sin embargo, son los pesticidas encontrados en los estudios toxicológicos realizados aquí y en otros trabajos de la provincia (Ferré et al., 2015; Saldeña et al., 2017). Estos resultados coinciden con los reportados por Caloni et al. (2016), quienes afirman que a pesar de estar prohibidos en la Unión Europea, son los tóxicos más usados en los casos de envenenamiento en animales domésticos. Guitart, et al. (2010) encontraron en su revisión un estudio en Bélgica de sesenta cebos envenenados en el periodo de 2003-2006, en el cual el 77% contenían pesticidas, siendo el carbofuran el más común, seguido de aldicarb y carbaryl.

Aldicarb es un insecticida de tipo carbamato que se utiliza por su acción nematocida y acaricida. Los principales metabolitos biológicamente activos del aldicarb (aldicarb sulfóxido y aldicarb sulfona) son plaguicidas sistémicos. La OMS ha clasificado toxicológicamente al aldicarb como extremadamente peligroso, en el grupo Ia (WHO, 2009). Según la IARC (1991) pertenece al grupo 3 en el cual el agente (mezcla o condición de exposición) no puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano. El aldicarb en Argentina tiene estrictas restricciones para su uso (SENASA Decreto 2121/1990), siendo prohibido en zonas donde se presenten conjuntamente las siguientes condiciones: dosis superiores a un kilo y medio (1,500 kg) del principio activo aldicarb por hectárea, temperatura del suelo inferior a 10°C; capacidad de retención de agua del suelo y del subsuelo (capacidad de campo) inferior al 15% en volumen; contenido de materia orgánica del suelo inferior a 1% en peso en los 30 cm superiores; subsuelo pH inferior a 6; precipitación media anual superior a 800 mm o riego equivalente.

Se han presentado casos accidentales de intoxicaciones en seres humanos al utilizar aldicarb como rodenticida (Lima y Reis, 1995). La DL 50 de aldicarb en caninos es de 6,5 mg/kg, ocurriendo la muerte por falla respiratoria (Arnot, Veale, Steyl y Myburgh, 2011). La DL 50 en humanos es de 0,8 mg/kg (Waseem, Perry, Bomann, Pai y Gernsheimer, 2010), de allí la importancia de control del uso indebido de estos tóxicos, al presentar el hombre mayor sensibilidad que otras especies. Aldicarb, además de ser usado como plaguicida, se sigue utilizando para intoxicaciones intencionales (Anastasio y Sharp, 2011; Martínez-Haro et al., 2008).

Carbofuran es un carbamato de acción sistémica y de contacto, de uso insecticida y nematocida en agricultura. Está incluido en la lista de plaguicidas altamente peligrosos de la Pesticide Action Network (PAN, 2014) y en la clasificación de toxicología aguda de la Organización Mundial de la Salud es categoría Ib, producto altamente tóxico (WHO, 2009). En nuestro país el carbofuran está prohibido en cultivos como peras y manzanas por decreto 2121/90, y cancelada la inscripción y la autorización de uso y comercialización por disposición 2367/2006 (SENASA). A pesar de esto, Ferré et al. (2015), encontraron que el 10% de sus entrevistados en el área rural sureste de Mendoza, aún usaba carbofuran.

Dada las prohibiciones y restricciones citadas para estos compuestos, se hipotetiza que aún quedan formulaciones comerciales indebidamente almacenadas.

La CCF y la detección de la actividad BChE son métodos económicos que no necesitan infraestructura especial; salvo por los testigos, todo fue de fácil acceso, lo que los lleva a ser métodos fácilmente adoptados por laboratorios de baja complejidad. Hay que tener presente que tanto las muestras como los testigos son peligrosos para la salud de los operarios, por lo que se necesita personal capacitado para tal fin y las condiciones de bioseguridad para trabajar con estos tóxicos.

La CCF fue muy útil para confirmar la presencia de plaguicidas carbamatos. Es ideal para el aislamiento e identificación de los componentes de las muestras, las cuales pueden ser de distintos tipos. La

otra ventaja es que compara varias muestras con varios testigos en una misma corrida cromatográfica. También es una buena herramienta para la resolución de litigios (Xavier, Righi, Flório y Spinosa, 2007). A diferencia de estos autores, quienes consideran que esta herramienta puede auxiliar al clínico en la presteza de la atención del paciente, el método no es tan rápido y la atención clínica de urgencia al paciente intoxicado debe instaurarse con celeridad. Sí se afirma que ayuda al establecimiento de medidas de prevención. En ese sentido, Spangenberg et al. (2011), relatan cómo la industria farmacéutica ya no utiliza este método para verificar medicamentos, debido a que no es fácilmente automatizable.

La CCF es un método cualitativo, sólo indica la presencia o ausencia del componente buscado, la concentración se deduce subjetivamente por la intensidad de la mancha producida. Xavier et al. (2007) probaron diferentes concentraciones para el CB aldicarb, el cual produjo manchas en la misma posición que el patrón conocido, o sea todos resultaron positivos; la única diferencia fue la intensidad de la mancha, la cual fue directamente proporcional a la cantidad de aldicarb presente en la muestra. de Siqueira et al. (2015) consideraron positivas aquellas muestras que reaccionaron con el reactivo cromogénico formando una mancha en el papel soporte a la misma distancia de corrida que la producida por el estándar.

Si bien existen otros métodos cromatográficos para la detección, e incluso la cuantificación de estos tóxicos, como la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) y la cromatografía gaseosa (CG) con diferentes detectores, éstos requieren equipos más sofisticados y muy costosos, requieren infraestructura y personal especializado, lo que significa análisis de alto costo (Xavier et al., 2007).

El kit de BChE tiene un método fácil de realizar, sensible, que es muy útil para indicar la presencia de compuestos anticolinesterásicos como son los CB y los OP. De acuerdo con Maia et al. (2012) es un método simple, reproducible y consistente en sus resultados; tiene diversas modificaciones y es fácilmente adaptable para ser usado en analizadores automáticos o lectores de placas, especialmente en el caso del plasma, permitiendo el

procesamiento de un gran número de muestras. La otra desventaja es que requiere de varios pasos para su realización, incluidas varias lecturas (Mulchandani, Chen, Mulchandani, Wang y Rogers, 2001). Es de recalcar que algunas patologías causan la inhibición de la BChE, en especial problemas hepáticos. Pero, un nivel disminuido de las actividades de las colinesterasas en tejidos de origen animal es un signo fuertemente indicativo de que se ha producido algún tipo de exposición a un agente inhibidor de esta enzima. La actividad de estas enzimas presenta no solamente variaciones inter-especies (Thompson, 1993), sino también geográficas, étnicas y latitudinales en poblaciones humanas, y además variaciones inter-individuales por factores genéticos (Brock y Brock, 1993; Carmona-Fonseca, 2007). En este trabajo se demostró que la inhibición de la actividad colinesterasa alcanzó una depresión del 75% respecto de los valores en los animales controles. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los distintos sexos en caninos controles.

Los factores ambientales también se ha detectado que afectan las colinesterasas, principalmente la temperatura (Hyne y Maher, 2003). Un número de variables ambientales han sido sugeridas como factores que pueden interferir con la interpretación exacta de la actividad AChE. En invertebrados, la temperatura emerge como el factor más importante que controla los niveles de la actividad e inhibición de la acetilcolinesterasa. Sin embargo, utilizando muestras controles, las cuales han tenido temperaturas ambientales similares, se puede eliminar esta fuente de variabilidad (Hyne y Maher, 2003). Por otro lado, los procedimientos analíticos y las temperaturas a la cual son medidas las enzimas, también influyen los resultados. Esta información es, generalmente, pobremente descrita, por lo que es difícil comparar los resultados (Kubkomawa, Tizhe, Nafarnda y Okoli, 2015).

En caninos, la BChE plasmática es mejor indicador que a la AChE ya que es inhibida en mayor grado, incluso antes de que se presenten los signos de intoxicación (Tecles y Cerón, 2003). Además, para la determinación, el sustrato utilizado es más estable con respecto a la temperatura y pH (Maia et al., 2012).

En la recopilación realizada por Maia et al. (2012), los valores medios obtenidos en caninos fisiológicamente normales con el método de Ellman fueron 3276 ± 845 UI/L. Según Furlanello et al., (2006), en el estudio realizado por ellos, la media encontrada en caninos con signos de intoxicación con anticolinesterásicos fue 487 ± 291 U/L, estableciendo con un grupo control un rango de referencia de 3405-6561 U/L. Otros valores se detallan en la tabla III.

Autores	Media \pm DE (UI/L)	CV (%)
Saccaro (2007)	3169 \pm 974	34,40
Tvarijonavičute et al. (2010)	3100 \pm 300	9,67
Tecles y Cerón (2001)	2310 \pm 260	11,25
Tecles et al. (2000)	2360 \pm 280	11,86

Tabla III: Actividad BChE plasmática en perros sanos según diversos investigadores. Adaptado de Maia et al. (2012). DE: desvío estándar. CV: coeficiente de variación.

La variabilidad expuesta en los resultados de la actividad BChE entre los distintos laboratorios y el presente trabajo evidencia la necesidad de disponer de valores locales propios.

Ambos métodos arrojan resultados en menos de 24h; sin embargo, en un paciente con signos compatibles con intoxicación por inhibidores de la colinesterasa es sabido que la instauración del tratamiento debe ser inmediato.

En una revisión sobre animales intoxicados, Guitart, Croubels, et al. (2010), expusieron la dificultad de reunir este tipo de episodios. En nuestro país, ni los veterinarios ni los propietarios están obligados a reportar los casos, ni a enviar muestras para su análisis toxicológico. Tampoco los resultados son publicados, siendo las únicas revisiones encontradas, las de eventos realizados en el hemisferio norte, Europa principalmente. También debemos exponer que no fue sencillo conseguir las formulaciones

comerciales utilizadas como testigos, éstos son de venta restringida y es difícil conseguir envases de volúmenes menores a 1Lt.; Guitart, Croubels, et al. (2010) agregan que al haber pocos tóxicos para investigar, los nuevos químicos pueden no ser descubiertos, siendo desestimados como falsos negativos.

Tal como se expuso en publicaciones realizadas por el mismo grupo de investigación que guiaron este estudio, es importante el control de la comercialización de plaguicidas, en especial de aquellos con bajas DL₅₀, la cual está reglamentada, para evitar este tipo de eventos, intencionales o no (Ferré et al., 2015). Por lo tanto, las denuncias obligatorias, las herramientas de diagnóstico orientativo o confirmatorio, y la instauración de un registro de las intoxicaciones, son útiles tanto para la fiscalización y control; teniendo en cuenta que es un problema que afecta tanto a animales como a la salud pública, orienta a los veterinarios en el diagnóstico y es útil para asesorar a los propietarios con respecto a medidas preventivas (Berny et al., 2010). Esto ayudaría a mejorar el plan de acción en virtud del tratamiento del paciente y efectuar un pronóstico preciso para los propietarios del mismo. El reporte de estos eventos en la casuística veterinaria tiene una implicancia directa en la tarea de control y fiscalización de uso de plaguicidas en una región, que pueden tener comercialización prohibida, pero que no han sido aún retirados del mercado (Saldeña et al., 2017).

En el país hay reportes ocasionales, no se han encontrado estadísticas locales, regionales ni nacionales de las poblaciones de animales domésticos involucrados en intoxicaciones tanto intencionales como accidentales. A diferencia de lo que sí existe en otros países, como explica Berny et al. (2010) en su revisión de episodios de intoxicación registrados entre 1998 y 2007 en Bélgica, Francia, Grecia, Italia y España.

Pineda (2007) explica la necesidad de establecer una vigilancia epidemiológica de intoxicaciones ya que éstas pueden ocasionar la muerte de quien se vea expuesto, puede prevenirse aplicando medidas adecuadas, la capacitación de operarios. La exposición ocasiona daños en la economía,

disminuye la producción y además deben considerarse los costos del tratamiento.

En la provincia muchos son los reportes en medios de comunicación sobre esta problemática, como por ejemplo en abril de 2010, en el diario local MDZ se publicó un artículo sobre un evento de intoxicación en el departamento de San Martín, donde fallecieron 25 caninos en una plaza departamental. Según el matutino, la Municipalidad de General San Martín supuso a través de los primeros peritajes que el tóxico usado fue paratión (Fernández, 2010).

En enero de 2015, en el diario digital G24 informó sobre el envenenamiento de 21 perros, de los cuales uno tuvo atención veterinaria, y se lo diagnosticó con envenenamiento con OP (DiPaola, 2015).

En octubre de 2015, en el mismo diario se publicó otro incidente, esta vez en el departamento de San Carlos, donde aparecieron entre 8 a 15 caninos muertos junto a restos de alimento usados como cebo, haciendo presumir un posible envenenamiento (MDZ, 2015).

La situación en el país es similar, en abril de 2012, en el partido de Bolívar, en la provincia de Buenos Aires, fueron hallados muertos unos 150 animales entre los que se encontraban perros, gatos, gallinas, patos, gansos y aves silvestres. Días después se dio a conocer que el tóxico involucrado fue "Furadán", nombre comercial del CB carbofurán (La Mañana Bolívar, 2012).

También en abril de 2012, pero en Necochea, provincia de Buenos Aires, se reportó el envenenamiento de un número no determinado de animales, en la nota se relatan dos casos que fueron atendidos en distintas veterinarias, donde uno fue diagnosticado con envenenamiento con estriquina, y el segundo con OP (Ecos Diarios, 2012).

En octubre de 2015, en Buenos Aires se reportó la intoxicación de al menos 8 perros. Según la entrevista al profesional que atendió a varios de los caninos, el pesticida usado en este caso fue "Lannate", marca comercial del CB metomil (WHO: Ib) (Noticias Tornquist, 2015).

En febrero del presente año, se suspendieron las fumigaciones en Río Negro debido a la intoxicación aguda de animales y personas (De Viedma, 2017).

Incluso la problemática sobre los efectos crónicos de los pesticidas ha tenido eco dentro y fuera del país, como puede leerse en las notas publicadas por Grossman (2016), para National Geographic, donde relata la preocupación de la población en la provincia de Chaco, por la investigación realizada en la zona de Avia Terai. Pressly, (2014), en el mes de Mayo de ese año, publicó para BBC, una investigación realizada en la misma zona, que relata los distintos efectos crónicos que acechan a los habitantes del lugar. El diario El Federal, de Buenos Aires, publicó en noviembre de 2016, una nota sobre una investigación realizada en Entre Ríos por parte de un programa de televisión italiano, donde relatan las condiciones en las que viven los habitantes de las zonas rurales del Litoral (Moyano, 2016). Todos estos describen los resultados de las intoxicaciones crónicas debidas a los pesticidas, especialmente la aparición de tumores de piel y problemas teratogénicos.

En todos los casos se reporta que hubo denuncia policial, en aquellos casos que llegaron a recibir atención médica, se pudo sospechar de intoxicación por pesticidas inhibidores de la colinesterasa, y en pocos se confirmó el agente específico o no se redactó el informe toxicológico correspondiente.

Ferré et al., (2015), confirmó el uso de Carbofurán en la intoxicación de dos caninos intoxicados en la zona norte y noreste de nuestra provincia.

La mayor dificultad que se encontró en la realización de este estudio fue la falta de muestras, sabiendo que los casos existieron y que la realización de las determinaciones era de público conocimiento. Se realizó una convocatoria por redes sociales, por carta formal al decanato de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales (UMaza) y al colegio de Médicos Veterinarios de la Provincia. Pero fue la puesta en conocimiento a profesionales amigos lo que nos acercó a las muestras biológicas. Tampoco hubiera sido posible sin la contención del grupo de investigación del GenAR.

Las determinaciones se hicieron en un laboratorio de baja complejidad, pueden ofrecerse como servicio para la identificación de pesticidas seleccionados para la intoxicación deliberada, y así, contribuir al establecimiento de mayores medidas de control y para alertar sobre la circulación de algunos pesticidas que están restringidos en su uso.

CONCLUSIÓN

- Se investigaron ocho animales (cinco caninos, un gato doméstico, dos torcacitas (*Columbina picui*)), con signos clínicos compatibles de intoxicación por organofosforados y carbamatos (cinco animales) y sin referencias (tres animales), para la medición de actividad butirilcolinesterasa sérica y búsqueda de agente químico causal por cromatografía en placa fina de sangre y/o contenido estomacal.
- Se realizó la medición de actividad butirilcolinesterasa sérica en 18 controles, caninos adultos machos y hembras clínicamente sanos. No presentaron diferencias estadísticamente significativas entre hembras y machos.
- La medición de actividad butirilcolinesterasa sérica fue $1127,71^{***} \pm 859,64$ en los cinco caninos estudiados, con diferencias estadísticamente significativas respecto de los animales controles = $4433,89 \pm 1443,14$ ($p < 0,0001$). Estos valores representan una depresión de la actividad enzimática del 75% en los animales intoxicados respecto de los controles.
- El insecticida carbamato aldicarb fue identificado en un canino y el insecticida carbamato carbofuran fue identificado en un canino y dos columbiformes. Estos cuatro animales, con depresión de butirilcolinesterasa, murieron.
- Las técnicas utilizadas en este trabajo son métodos económicos que no necesitan infraestructura especial, siendo métodos fácilmente adoptados por laboratorios de baja complejidad.
- La determinación de butirilcolinesterasa fue orientativa de la presencia de compuestos anticolinesterásicos, mientras que la cromatografía en placa fina permitió identificar dos insecticidas carbámicos. Ambos métodos aportaron en forma complementaria.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, José Luis, Laura, Romina y Marcos por estar siempre presentes, alentándome a seguir mis sueños. A mis abuelas que desde arriba siempre están presentes. Muchas gracias porque sin Uds. no habría llegado hasta acá.

A mi Directora, la Dra. Nora Gorla, por acompañarme y brindarme todo su apoyo y sabiduría para realizar este trabajo. Y a través de ella mis agradecimientos a todo el laboratorio GenAR, donde encontré personas de mucha calidad humana y profesional, en especial a la Vet. Daniela Ferré por su tiempo y dedicación.

A la Vet. Eliana Saldeña, quien fue parte de este trabajo, brindando su apoyo y conocimiento. Gracias por la confianza.

A todos los profesionales que ayudaron a la realización de este trabajo, que cedieron las muestras que fueron utilizadas para las determinaciones. A los profesionales de la Veterinaria Hocicos, Veterinaria VetPlus, Veterinaria Maraña y, en especial, Veterinaria Cumelén cuyos profesionales y no profesionales son los que más admiro y quiero.

A mis amigos, porque sin su apoyo en todo momento, todo habría sido más difícil. Gracias por estar en los momentos más importantes brindando siempre sus mejores consejos.

A toda la gente que encontré durante toda la vida, que me enseñaron cada una lecciones que me hicieron la persona que soy ahora.

BIBLIOGRAFÍA

- Anastasio, J. D., & Sharp, C. R. (2011). Acute aldicarb toxicity in dogs: 15 cases (2001–2009). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 21(3), 253-260. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2011.00613.x>
- Arnot, L. F., Veale, D. J. H., Steyl, J. C. A., & Myburgh, J. G. (2011). Treatment rationale for dogs poisoned with aldicarb (carbamate pesticide). *Journal of the South African Veterinary Association*, 82(4), 232-238.
- Badii, M. H., & Varela, S. (2015). Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente. *CULCyT*, 0(28). Recuperado a partir de <http://openjournal.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/375>
- Bardin, P. G., Eeden, S. F. van, Moolman, J. A., Foden, A. P., & Joubert, J. R. (1994). Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Archives of Internal Medicine*, 154(13), 1433-1441. <https://doi.org/10.1001/archinte.1994.00420130020005>
- Bedmar. (2011). ¿Qué son los plaguicidas? *Ciencia Hoy*, 21(122), 11-16.
- Berny, P., Caloni, F., Croubels, S., Sachana, M., Vandebroucke, V., Davanzo, F., & Guitart, R. (2010). Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 183(3), 255-259. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.034>
- Brock, A., & Brock, V. (1993). Factors affecting inter-individual variation in human plasma cholinesterase activity: body weight, height, sex, genetic polymorphism and age. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24(1), 93-99.

- Butinof, M., Fernandez, R. A., Stimolo, M. I., Lantieri, M. J., Blanco, M., Machado, A. L., ... Díaz, M. del P. (2015). Pesticide exposure and health conditions of terrestrial pesticide applicators in Córdoba Province, Argentina. *Cadernos de Saúde Pública*, 31(3), 633-646. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00218313>
- Cabagna, M. C., Lajmanovich, R. C., Stringhini, G., Sanchez-Hernandez, J. C., & Peltzer, P. M. (2005). Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Applied Herpetology*, 2(4), 373-380. <https://doi.org/10.1163/157075405774483085>
- Caloni, F., Cortinovich, C., Rivolta, M., & Davanzo, F. (2016). Suspected poisoning of domestic animals by pesticides. *Science of The Total Environment*, 539, 331-336. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.005>
- Carmona-Fonseca, J. (2007). Colinesterasas en sangre total medidas con técnica semicuantitativa y en eritrocitos o plasma medidas con técnicas cuantitativas: relaciones. *Biomédica*, 27(2), 244-56. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i2.220>
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 221-225. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.002>
- Chicharro, Bautista, Benayas, & Ortiz. (s. f.). CROMATOGRAFÍA. PRINCIPIOS Y APLICACIONES. Recuperado a partir de <http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/40743382/Cromatografia-Principios-y->

Aplicaciones.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1501552138&Signature=ryQioCSEVj8QsLmuOOIHJ15Lblk%3D
&response-content-
disposition=inline%3B%20filename%3DCromatografia_Principios_y_A
plicaciones.pdf

Colinesterasa-GT Lab. (s. f.). Recuperado a partir de
http://www.gtlab.com.ar/UserFiles/mediaManager/1/f76f5fa25038a92c99309e4366bb11f25a3e1ec0_17dc96b2936b9e549d483638a22acabe2f0680b9.pdf

De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., & Costa, J. L. (2014). Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, *107*, 423-431.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.039>

de Siqueira, A., Salvagni, F. A., Yoshida, A. S., Gonçalves-Junior, V., Calefi, A. S., Fukushima, A. R., ... Maiorka, P. C. (2015). Poisoning of cats and dogs by the carbamate pesticides aldicarb and carbofuran. *Research in Veterinary Science*, *102*, 142-149.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.006>

De Viedma. (2017, febrero 24). Suspenden fumigaciones en el Idevi. Recuperado 5 de marzo de 2017, a partir de
<http://www.rionegro.com.ar/viedma/suspenden-fumigaciones-en-el-idevi-GN2285769>

DiPaola, V. (2015, enero 14). Rodeo de la Cruz: mueren 21 perros por envenenamiento. Recuperado 13 de junio de 2017, a partir de

<https://www.diariog24.com/rodeo-de-la-cruz-mueren-21-perros-por-envenenamiento/>

Ecobichon. (2001). Toxic Effects of Pesticides. En *Toxicology. The Basic Science of Poisons* (6ta ed., pp. 763-810). McGraw - Hill Professional.

Ecos Diarios. (2012, abril 14). Preocupación por envenenamiento de perros en la zona del Parque - Ecos Diarios. Recuperado 28 de abril de 2017, a partir de <http://www.ecosdiariosweb.com.ar/la-ciudad/2012/4/14/preocupacion-envenenamiento-perros-zona-parque-17117.html>

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.

Etchegoyen, M. A., Ronco, A. E., Almada, P., Abelando, M., & Marino, D. J. (2017). Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Paraná basin. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(2), 63. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5773-1>

FAO. (s. f.). Capítulo 1: Introducción. Recuperado 7 de abril de 2017, a partir de <http://www.fao.org/docrep/W1604S/w1604s04.htm>

Fernández, C. (2010, abril 1). Cruel matanza de animales: aparecieron 25 perros muertos en una plaza de San Martín - MDZ Online. Recuperado a partir de <http://www.mdzol.com/nota/200718-cruel-matanza-de-animales-aparecieron-25-perros-muertos-en-una-plaza-de-san-martin/>

Fernández, D., Mancipe, & Fernandez, D. (2010). ORGANOPHOSPHORUS POISONING. *Revista Med*, 18(1), 84-92.

- Ferré, D. M., Saldeña, E. L., Albarracín, L., Neuilly, V., & Gorla, N. B. (2015). Inhibición de butirilcolinesterasa en dos perros intoxicados y confirmación analítica de carbofuran como agente causal. *Revista veterinaria*, 26(1), 43-48.
- Flanagan, R., Braithwaite, R., Brown, S., Widdop, B., & de Wolff, F. (1995). *Basic analytical toxicology*. Geneva: World Health Organization.
- Flores Soto, & Segura Torres. (2005). Structure and function of the acetylcholine of muscarinical and nicotinical type. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 6(4), 315-326.
- Furlanello, T., Simonato, G., Caldin, M., Lorenzi, D. D., Lubas, G., Bernardini, D., & Solano-Gallego, L. (2006). Validation of an Automated Spectrophotometric Assay for the Determination of Cholinesterase Activity in Canine Serum. *Veterinary Research Communications*, 30(7), 723-733. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3354-9>
- Gonzalez, M., Miglioranza, K. S. B., Aizpún, J. E., Isla, F. I., & Peña, A. (2010). Assessing pesticide leaching and desorption in soils with different agricultural activities from Argentina (Pampa and Patagonia). *Chemosphere*, 81(3), 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.021>
- González Vides, G. (2011). *Intoxicación por Plaguicidas: Casuística del Hospital Universitario del Caribe y de la Clínica Universitaria San Juan de Dios de Cartagena. 2009 – 2010*. (masters). Universidad Nacional de Colombia. Recuperado a partir de <http://www.bdigital.unal.edu.co/4258/>

- Grossman. (2016, febrero 23). A Town Demands Protection from Pesticides. Recuperado 5 de marzo de 2017, a partir de <http://news.nationalgeographic.com/2016/02/160223-photograph-aixa-argentina-avia-terai-pesticides-glyphosate/>
- Guitart, R., Croubels, S., Caloni, F., Sachana, M., Davanzo, F., Vandebroucke, V., & Berny, P. (2010). Animal poisoning in Europe. Part 1: Farm livestock and poultry. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 183(3), 249-254. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.002>
- Guitart, R., Sachana, M., Caloni, F., Croubels, S., Vandebroucke, V., & Berny, P. (2010). Animal poisoning in Europe. Part 3: Wildlife. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 183(3), 260-265. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.033>
- Gupta, R. C. (2012). *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Academic Press.
- Gwaltney-Brant, S. M. (2016). Veterinary Forensic Toxicology. *Veterinary Pathology*, 53(5), 1067-1077. <https://doi.org/10.1177/0300985816641994>
- Hernán, E., Arias, A., Xavier, W., & Llanda, C. (2013). Determinación de compuestos piretroides en muestras de aspirado gástrico por el método de cromatografía en capa fina que ingresan al laboratorio de química forense del departamento de criminalística de la policía judicial de chimborazo. Recuperado a partir de <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/1182>

- Hill, Wyse, & Anderson. (2006). Sinapsis. En *Fisiología Animal* (pp. 365-404). Editorial Médica Panamericana S.A.
- Hyne, & Maher. (2003). Invertebrate biomarkers: Links to toxicosis that predict population decline. *ResearchGate*.
[https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00119-7)
- IARC. (s. f.). IARC Monographs- Classifications. Recuperado 30 de noviembre de 2016, a partir de http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., & Schulz, R. (2005). Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*, 61(6), 817-826.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.036>
- Kubkomawa, Tizhe, Nafarnda, & Okoli. (2015). Effects of environment, sex, breed, management and season on some serum enzyme profile of pastoral zebu cattle in Nigeria | Journal Dynamics. Recuperado 11 de agosto de 2017, a partir de <http://journaldynamics.org/abstract/kubkomawa-et-al-2/>
- La Mañana Bolívar. (2012, abril 15). Se conoció el veneno usado en la matanza de animales en Pirovano : La MAÑANA Bolívar. Recuperado 28 de abril de 2017, a partir de http://www1.tucuman.gov.ar/noticias/informacion-general/se-conocio-el-veneno-usado-en-la-matanza-de-animales-en-pirovano_a30890

- Lima, J. S., & Reis, C. A. (1995). Poisoning due to illegal use of carbamates as a rodenticide in Rio de Janeiro. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 33(6), 687-690.
- Loewy, R. M., Monza, L. B., Kirs, V. E., & Savini, M. C. (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46(8), 662-670.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2012.592051>
- Maia, A. R., López, M. P., & Rodríguez, F. S. (2012). Comparación de tres métodos de determinación de la actividad colinesterasa plasmática en perro. *Revista de Toxicología*, 29(2), 135-140.
- Marino, Rimoldi, Demetrio, Peluso, & Ronco. (2014). Niveles de plaguicidas en agroecosistemas de la provincia de Buenos Aires. Recuperado 10 de agosto de 2017, a partir de http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=26116&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=2617992
- Marrs, T. C. (2012). *Mammalian Toxicology of Insecticides*. Royal Society of Chemistry.
- Martínez-Haro, M., Mateo, R., Guitart, R., Soler-Rodríguez, F., Pérez-López, M., María-Mojica, P., & García-Fernández, A. J. (2008). Relationship of the toxicity of pesticide formulations and their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(3), 396-402.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.05.006>
- MDZ. (2015, octubre 1). Vecinos indignados por perros envenenados en San Carlos - MDZ Online. Recuperado a partir de

<http://www.mdzol.com/nota/632487-vecinos-indignados-por-perros-envenenados-en-san-carlos/>

Monteagudo Jimenez. (2002). SNA. Agonistas y Antagonistas muscarínicos. Inhibidores de la acetilcolinesterasa. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* (1º, pp. 107-115). McGraw - Hill. Interamericana.

Moyano. (2016, noviembre 6). Italia difunde la tragedia argentina de los agroquímicos. Recuperado 5 de marzo de 2017, a partir de <http://www.elfederal.com.ar/italia-difunde-la-tragedia-argentina-de-los-agroquimicos/>

Mulchandani, A., Chen, W., Mulchandani, P., Wang, J., & Rogers, K. R. (2001). Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(4–5), 225-230. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00126-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00126-9)

Muñoz Cobeñas. (2002). Antiparasitarios Externos. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* (pp. 505-516). McGraw - Hill. Interamericana.

Noticias Tornquist. (2015, octubre 31). Preocupación y alerta por envenenamiento de perros. Recuperado 28 de abril de 2017, a partir de <http://noticiastornquist.com.ar/noticias/2015/10/31/preocupacion-por-envenenamiento-de-perros/>

PAN International | Pesticide Action Network. (s. f.). Recuperado 24 de julio de 2017, a partir de <http://www.panna.org/pan-international>

Peterson, & Talcott. (2006). *Small animal toxicology*. Elsevier.

Pina. (2012). *Clasificación Toxicológica y Etiquetado de Productos Fitosanitarios. Criterios Regulatorios Locales e Internacionales*. Argentina: CASAFE. Recuperado a partir de

<http://www.casafe.org/pdf/2015/DOCUMENTOS/Clasificacion-toxicologica-etiquetado.pdf>

Pineda, J. (2007). Plaguicidas: Monitoreo Efectivo de la Exposición a Carbamatos y Órgano-Fosforados. *Ciencia & Trabajo*, 26.

Pórfido. (2014, enero). Plaguicidas en la República Argentina. Departamento de Salud Ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación. Ministerio de Salud de la Nación, 2013.

Pressly, L. (2014, mayo 14). Are pesticides linked to health problems in Argentina? *BBC News*. Recuperado a partir de <http://www.bbc.com/news/magazine-27373134>

Román, P., A, D., Elomnzantal, D. B., M, S., Tedesco, D., G, N., & Burger Fernández, M. (2000). Intoxicación aguda por organofosforados. Factores de riesgo. *Rev. méd. Urug*, 5-13.

Saldeña, E. L., Hynes, V., Ferré, D. M., Quero, M., Neuilly, V., & Gorla, N. B. (2017). Evento de intoxicación en perros de zona urbana mediante cebos contaminados con aldicarb. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (en prensa)*.

Sánchez-Barbudo, I. S., Camarero, P. R., & Mateo, R. (2012). Intoxicaciones intencionadas y accidentales de fauna silvestre y doméstica en España: diferencias entre Comunidades Autónomas. Recuperado 5 de marzo de 2017, a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91925068006>

Silk, E., King, J., & Whittaker, M. (1979). Assay of Cholinesterase in Clinical Chemistry: Prepared for the Scientific and Technical Committee of the

- Association of Clinical Biochemists. *Annals of Clinical Biochemistry*, 16(1-6), 57-75. <https://doi.org/10.1177/000456327901600114>
- Soplin Almeida. (2013, diciembre). *ACETILCOLINA*. Saúde e medicina. Recuperado a partir de https://pt.slideshare.net/comun_y_silvestre/acetilcolina-28871202
- Spangenberg, Poole, & Weins. (2011). Theoretical Basis of Thin Layer Chromatography (TLC). En *Quantitative Thin-Layer Chromatography* (p. pp.13-52). Springer.
- Tecles, F., & Cerón, J. J. (2003). DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COLINESTERASA EN SANGRE ENTERA DE ANIMALES DOMÉSTICOS: FACTORES PRE Y ANALÍTICOS. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 19(0), 61-76.
- Thompson, H. M. (1993). Avian serum esterases: species and temporal variations and their possible consequences. *Chemico-Biological Interactions*, 87(1-3), 329-338.
- Tiwari, & Sinha. (2010). Toxicology of Insecticides. En *Veterinary Toxicology* (2010.^a ed., pp. 17-38). Oxford Book Company.
- Verster, R. S., Botha, C. J., Naidoo, V., & Van Schalkwyk, O. L. (2004). Aldicarb poisoning of dogs and cats in Gauteng during 2003. *Journal of the South African Veterinary Association*, 75(4), 177-181.
- Waseem, M., Perry, C., Bomann, S., Pai, M., & Gernsheimer, J. (2010). Cholinergic Crisis after Rodenticide Poisoning. *Western Journal of Emergency Medicine*, 11(5), 524-527.

- WHO. (2010). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. Recuperado a partir de <http://www.who.int/iris/handle/10665/44271>
- Xavier, F. G., Righi, D. A., Flório, J. C., & Spinosa, H. S. (2007). Thin-layer chromatography for aldicarb poisoning diagnosis in dogs and cats. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(5), 1231-1235. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000500020>
- Zuccolilli. (2002). Bases fisiológicas de la neurotransmisión. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* (1º, pp. 89-106). McGraw - Hill. Interamericana.