

Trabajo Original

Toxicología analítica

Intoxicación con rodenticidas superwarfarínicos desde el laboratorio toxicológico

Clara Magdalena López^{*}, Valentina Olmos

Cátedra de Toxicología y Química Legal-CENATOXA. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junin 956—7° piso (CP: CA1113ADD)

Tel/Fax: ++54-11- 4964-8283/84

Correo electrónico: cmlopez@ffyb.uba.ar

*Autor a quien dirigir la correspondencia

Resumen

Los raticidas anticoagulantes "superwarfarínicos" provocan intoxicaciones intencionales y no intencionales de diversa gravedad que pueden requerir tratamientos prolongados y re-hospitalizaciones.

Se presentan datos analíticos de tres casos de intoxicación con "superwarfarínicos". Los casos seleccionados incluyeron diferentes edades, sexo, etiología, dosis ingeridas y tipo de compuesto involucrado. Brodifacoum, bromadiolone y difenacoum fueron identificados y cuantificados en suero utilizando HPLC con detección ultravioleta y fluorométrica.

Abstract

Superwarfarin rodenticides are responsible of many intentional and nonintentional poisonings with different severity grades that could require long treatment and readmissions at emergency department.

In this report we present analytical data of three superwarfarin poisonings. The cases reported differ in the age and sex of the patients, the aetiology, the doses ingested and the compound involved. Serum identification and quantification of brodifacoum, bromadiolone and difenacoum were performed by HPLC with ultraviolet and fluorometric detection.

Introducción

Los rodenticidas anticoagulantes de segunda generación, llamados comúnmente "superwarfarínicos" (SW), son compuestos relativamente nuevos con una estructura química compleja que fueron desarrollados como consecuencia de la aparición de roedores resistentes a la warfarina (Figura 1).

Su mecanismo de acción es similar al de la warfarina pero su potencia es 100 veces mayor. En los mamíferos, incluido el hombre, alteran el proceso de la coagulación sanguínea generando hemorragias masivas. Se comportan como antagonistas de la vitamina K₁ dado que inhiben las enzimas vitamina K₁ 2,3 epóxido reductasa y vitamina K₁ reductasa (Figura 2), disminuyendo de esta forma la producción de los factores de la coagulación vitamina K dependientes II, VII, IX y X (1-5).

La principal vía de ingreso al organismo humano es la oral, aunque también se pueden absorber por la vía dérmica y por la vía inhalatoria (3). En el tracto gastrointestinal son bien absorbidos y se acumulan principalmente en el hígado donde se unen fuertemente a sitios lipofílicos (3). Su eliminación se realiza a través de las heces (3).

Las intoxicaciones pueden ser intencionales y no intencionales, pudiendo cursar con disminución de la actividad de protrombina ocasionando en los casos graves, sangrados intensos.

Según datos aportados por el Departamento de Registros de Productos Domisanitarios del Instituto Nacional de Alimentos (INAL), en la Argentina se comercializan actualmente 63 formulaciones rodenticidas con sustancias anticoagulantes; el 52,4% son de venta libre y de éstas, el 91,1 % contienen brodifacoum, bromadiolone o difenacoum (Tabla 1).

En el Centro de Asesoramiento Toxicológico Analítico (CENATOXA) que funciona en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires en los últimos 6 años se ha observado que los casos de sospecha de intoxicación con estos compuestos han ido en aumento, especialmente en la población infantil, que es la más vulnerable a

padecer las intoxicaciones no intencionales. En los adultos las causas más frecuentes de intoxicación son aquellas relacionadas con autointoxicaciones o intentos de suicidio.

Se presentan tres casos de intoxicación con "superwarfarínicos" en pacientes de diferentes edades.

Caso 1:

Paciente de sexo masculino de 40 años, que las 6 horas ingirió con intención suicida 500 mililitros de un raticida que contenía bromadiolone 2,5%. Consultó 12 horas después a un servicio de guardia, no presentando ningún síntoma al ingreso. A los tres días de internación el tiempo de protrombina fue de 42 segundos (55%) y la cuantificación de bromadiolone en suero arrojó un valor de 525 ng/ml. Desde el momento de la internación y hasta un mes después el paciente recibió vitamina K₁. Un control del tiempo de protrombina efectuado a los 33 días de la intoxicación arrojó un resultado del 94% y la cuantificación del raticida en el suero fue negativa .

Caso 2:

Un niño de 2 años de edad fue sorprendido en horas de la mañana por su madre jugando con un recipiente conteniendo un raticida cuya composición declarada en la etiqueta decía que se trataba de difenacoum al 0,005%. El ingreso al hospital se produjo al atardecer bajo la sospecha de intoxicación con difenacoum. En el momento del ingreso se le realizó un tiempo de protrombina que fue normal, siendo dado de alta a las pocas horas. Tres días después fue readmitido en la guardia, presentando una actividad protrombínica del 30%. Al quinto día de la intoxicación la actividad protrombínica fue del 55%. Al sexto día de la intoxicación se solicitó al laboratorio la cuantificación de difenacoum en suero, identificándose el mismo y encontrando un valor inferior al límite de cuantificación del método (41,3 ng/ml).

Caso 3:

Paciente del sexo femenino de 18 años de edad que ingresó a un servicio de guardia con hematuria y hematomas, de dos meses de evolución. En el momento del ingreso la actividad protrombínica fue menor del 10% y el tiempo de tromboplastina parcial con caolín (KPTT) fue de 66 segundos. Se cuantificaron los factores de la coagulación II y V (18 y 70%, respectivamente), encontrándose disminuído sólo el factor II vitamina K dependiente. La funcionalidad hepática no se encontraba alterada.

En el suero de la paciente se pudo identificar la presencia de brodifacoum, cuya concentración fue inferior al límite de cuantificación del método (17,5 ng/ml). Frente a la evidencia analítica, la paciente admitió haber ingerido con fines suicidas 60 días antes de la obtención de la muestra, un raticida que contenía el compuesto hallado.

Materiales y métodos

En todos los casos, la concentración de los compuestos "superwarfarínicos" sospechados de producir las intoxicaciones se midió utilizando cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detección ultravioleta (UV) y fluorométrica (F). El método consistió en realizar una extracción líquido-líquido del suero utilizando una mezcla de cloroformo:acetona (1:1, v/v). Previamente, el suero debió ser tamponado a pH 5,5 con buffer citrato/fosfato. Luego de agitar en agitador rotatorio treinta minutos se separaron las fases mediante centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos, descartándose la acuosa. La fase orgánica se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 37 °C, y el residuo se reconstituyó con 200 µl de metanol (6).

Se utilizó un cromatógrafo líquido Jasco PU-980, provisto con un inyector automático AS-950 y detectores ultravioleta (UV-975) y de fluorescencia (FP-920). La columna cromatográfica empleada fue Partisil 5 ODS-3 RAC II 4,6 x 100 mm (Whatman). La fase móvil fue metanol/agua/ácido acético glacial (792:200:8) y el flujo de trabajo fue de 0,7 ml/min.

Las longitudes de onda fueron: a) detector UV: 254 nm; b) detector FP: excitación 248 nm y emisión 385 nm. El volumen de inyección fue de 20 microlitros y las corridas cromatográficas se realizaron a temperatura ambiente.

Discusión:

Los roedores son animales que viven a expensas del hombre, provocando un gran daño a éste y su entorno por lo que constituyen una plaga que debe ser controlada. Sin embargo, el problema del control es complejo porque involucra distintos ambientes y diferentes especies por lo que las infestaciones pueden prevenirse de diversas maneras (7). Una de ellas es el uso de sustancias rodenticidas.

Los rodenticidas tradicionales como el talio, el cianuro, la estricnina, el arsénico, etc. fueron dejados de lado paulatinamente como consecuencia de su elevada toxicidad, baja aceptabilidad y falta de eficacia; en su reemplazo surgieron los compuestos anticoagulantes como la warfarina y más recientemente los denominados "superwarfarínicos" que actúan como aquella, impidiendo la coagulación de la sangre, pero se presentan como más efectivos y seguros.

Sin embargo, cada año se describen en la bibliografía casos de intoxicaciones humanas (8-14) como consecuencia de la ingestión intencional y no intencional de SW. Las intoxicaciones no intencionales generalmente ocurren en los niños y cursan sin síntomas clínicos o alteraciones de la coagulación (10), mientras que las intoxicaciones como consecuencia de autointoxicaciones deliberadas son frecuentes en adultos y cursan con coagulopatías prolongadas (11, 12) que en algunos casos llevan a la muerte (13, 14).

En el CENATOXA se reciben alrededor de 4000 pacientes por año y se realizan cerca de 10.000 análisis de diferentes tóxicos o biomarcadores de intoxicación. La cuantificación de los compuestos "superwarfarínicos" comenzó a realizarse en el Centro a partir del año 2000 utilizando la tecnología HPLC con detección ultravioleta y fluorométrica (UV y FP). El método cromatográfico utilizado (fase reversa, isocrático) permitió resolver la mezcla de brodifacoum, bromadiolone y difenacoum en 10 minutos (6). La curva de calibración realizada con los estándares correspondientes mostró ser lineal en un rango de concentración de 30 a 2000 ng/ml. La mejor correlación estuvo dada por el detector UV ($R^2 > 0,9910$).

En el desarrollo del método se ensayaron varios sistemas de solventes para extraer los compuestos del suero, resultando ser la mezcla cloroformo:acetona (1:1, v/v) descrita por Kuijpers y col (15) la más apta para ello.

El sistema desarrollado permitió cuantificar rápidamente y con una óptima sensibilidad los compuestos ensayados. En las condiciones de trabajo utilizadas no se observó interferencia de la vitamina K₁, antídoto específico en las intoxicaciones superwarfarínicas, ni de los raticidas de primera generación warfarina y coumatetralil. En la tabla 2 se indican los límites de detección y cuantificación obtenidos para los tres compuestos, con ambos detectores.

En el período 2000-2005 se recibieron en el CENATOXA 31 consultas analíticas para cuantificar SW en suero de pacientes supuestamente intoxicados con estos compuestos, 25 de las cuales correspondieron al trienio 2003-2005 (81%).

La metodología utilizada (HPLC) permitió detectar y cuantificar los tres SW que se encuentran presentes con mayor frecuencia en las formulaciones raticidas que se comercializan como productos domisanitarios en la Argentina (brodifacoum, bromadiolone y difenacoum) (Tabla 1).

En siete de los casos estudiados (22,5 %) fue posible confirmar en suero la presencia de algunos de los compuestos arriba mencionados.

Los tres casos presentados en este trabajo involucraron pacientes de diferentes edades. En el niño de dos años la intoxicación fue no intencional hogareña mientras que en los adultos tuvo una motivación suicida.

En el niño y en el adulto de sexo masculino la consulta a un servicio de guardia se efectuó aproximadamente 12 horas después de la ingestión. Si bien las cantidades ingeridas fueron diferentes, en el momento del ingreso los pacientes no presentaron sintomatología alguna y el tiempo de protrombina fue normal.

La paciente de 18 años, pese a tener trastornos de la coagulación marcados, negó sistemáticamente el consumo de algún compuesto anticoagulante hasta que el laboratorio evidenció la presencia de brodifacoum en el suero, obtenido 60 días después de la ingesta.

La investigación de los compuestos "superwarfarínicos" en suero debería ser solicitada de rutina frente a cualquier trastorno de la coagulación de origen desconocido. Si bien las intoxicaciones causadas por estos agentes en la mayoría de los casos no son mortales, los intoxicados pueden presentar una anticoagulación persistente que puede durar meses, por lo que deben recibir tratamientos prolongados con vitamina K₁.

La evaluación bioquímica de los pacientes con sospecha de envenenamiento con raticidas anticoagulantes debería incluir la determinación del tiempo de protrombina, del KPTT, de la concentración de los factores de la coagulación y la investigación y cuantificación del SW en el suero (obtenido entre 12 y 15 horas después de la ingesta).

En el caso de que la intoxicación haya sido confirmada, es recomendable efectuar controles periódicos de la concentración del SW en el suero, ya que la información acerca de la cinética de eliminación y la vida media de estos compuestos es escasa y contradictoria. En el caso 1 presentado, el paciente tuvo una concentración sérica inicial de bromadiolone de 525 ng/ml que se negativizó después de treinta días, durante los cuales recibió tratamiento; en cambio en el caso 3 (la paciente negó la ingesta de algún tóxico) se detectó brodifacoum en el suero sesenta días después de la ingesta.

Generalmente el punto final del tratamiento en los intoxicados con "superwarfarínicos" se establece discontinuando la administración de vitamina K₁ y observando la evolución de la actividad de la protrombina; sin embargo esta estrategia podría colocar a los pacientes ante la posibilidad de sangrado si aún existe el superwarfarínico en circulación. Frente a este riesgo es recomendable el seguimiento del paciente a través de controles analíticos periódicos de los niveles de "superwarfarínicos" en suero, con la finalidad de optimizar y establecer de manera segura el punto final de la terapia con vitamina K₁.

De acuerdo con nuestra experiencia se propone cuantificar los superwarfarínicos en suero diariamente los tres primeros días, luego cada 10 días hasta los 2 meses y posteriormente cada 30 días hasta la obtención de 2 resultados negativos consecutivos.

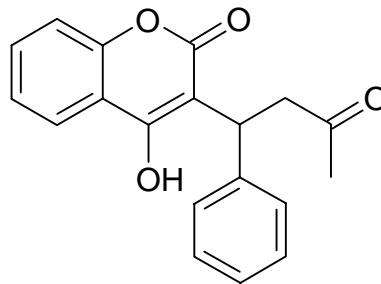
Bibliografía

1. Park, B.K. and Leck, J.B. (1982). A comparison of vitamin K antagonism by warfarin, difenacoum and brodifacoum in the rabbit. *Biochem. Pharmac.* 31(22): 3635-3639
2. Leck, J.B. and Park, B.K. (1981). A comparative study of the effects of warfarin and brodifacoum on the relationship between vitamin K1 metabolism and clotting factor activity in warfarin-susceptible and warfarin-resistant rats. *Biochem. Pharmacol.* 30: 123-27
3. International Programme on Chemical Safety (1995). *Environmental Health Criteria* N° 175. Anticoagulant Rodenticides. World Health Organization, Geneve.
4. Breckenridge, A.; Leck, J.B.; Serlin, M.J. and Wilson, A. (1978). Mechanisms of action of the anticoagulants warfarin, 2-chloro-3-phytylnaphtoquinone (CL-K), acenocoumerol, brodifacoum and difenacoum in the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 64: 339
5. Ecobichon, D.J. (1995). *Toxic Effects of Pesticides. Casarett & Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons.* Klaassen, C.D. (ed). McGraw-Hill, 5th Ed. New York, 643 pp.
6. Olmos, V; Lenzken, SC; Paz, M; Olivera, NM; Dominguez, S; López, CM; Roses, OE (2004). Cuantificación de brodifacoum, bromadiolone y difenacoum en suero humano por HPLC con detección ultravioleta y fluorométrica. *Acta Toxicol. Argent.* 12 (1): 9-14.
7. Nicolini, P. (2000). Rodenticidas anticoagulantes de segunda generación. *Acta Toxicol. Argent.* 8 (1): 21-22
8. Smolinske, S.C.; Scherger, D.L.; Kearns, P.S.; Wruk, K.M.; Kulig, K.W.; and Rumack, B.H. (1989). Superwarfarin Poisoning in Children: a Prospective Study. *Pediatrics* 84 (3): 490-4
9. Watts, R.G.; Castleberry, R.P. and Sadowski, J.A. (1990). Accidental Poisoning with a Superwarfaarin Compound (Brodifacoum) in a Child. *Pediatrics* 86 (6): 883-7

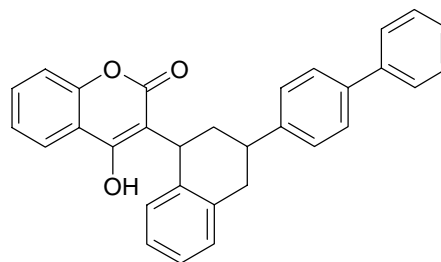
10. Chua, J.D. and Friedenber, W.R. (1998). Superwarfarin Poisoning. Arch. Intern. Med. 158: 1929-1932.
11. Lipton, R.A. and Klass, E.M. (1984). Human ingestion o a superwarfarin rodenticide resulting in a prolonged anticoagulant effect. JAMA 252 (21): 3004-3005.
12. Stanton, T.; Sowray, P.; McWaters, D.; Mount, M. (1988). Prolonged Anticoagulation with Long-acting Coumadin Derivatives: Case Report of a Brodifacoum Poisoning with Pharmacokinetic Data. Blood. 72(suppl1):310a Abstract.
13. Routh, C.R.; Triplett, D.A.; Murphy, M.J.; Felice, L.J.; Sadowski, J.A. and Bovill, E.G.T. (1991). Superwarfarin ingestion and detection. American Journal of Hematology 36: 50-54.
14. Palmer, R.B.; Alakija, P.; de Baca, J.E.C. and Nolte, K.B. (1999). Fatal brodifacoum rodenticide poisoning: autopsy and toxicologic findings. J. Forensic Sci. 44 (4): 851-855.
15. Kuijpers, E.A.P.; den Hartigh, J.; Savelkoul, T.J.F. and de Wolff, F.A. (1995). A method for the simultaneous identification and quantitation of five superwarfarin rodenticides in human serum. J. Anal. Toxicol. 19: 557-562.

Figura 1

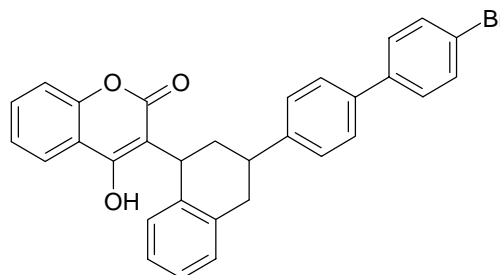
Estructura química de la warfarina



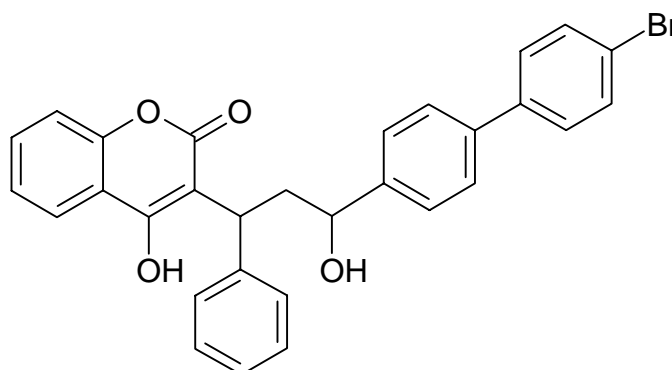
Estructura química de algunos compuestos "superwarfarínicos" que se comercializan en la argentina



Difenacoum

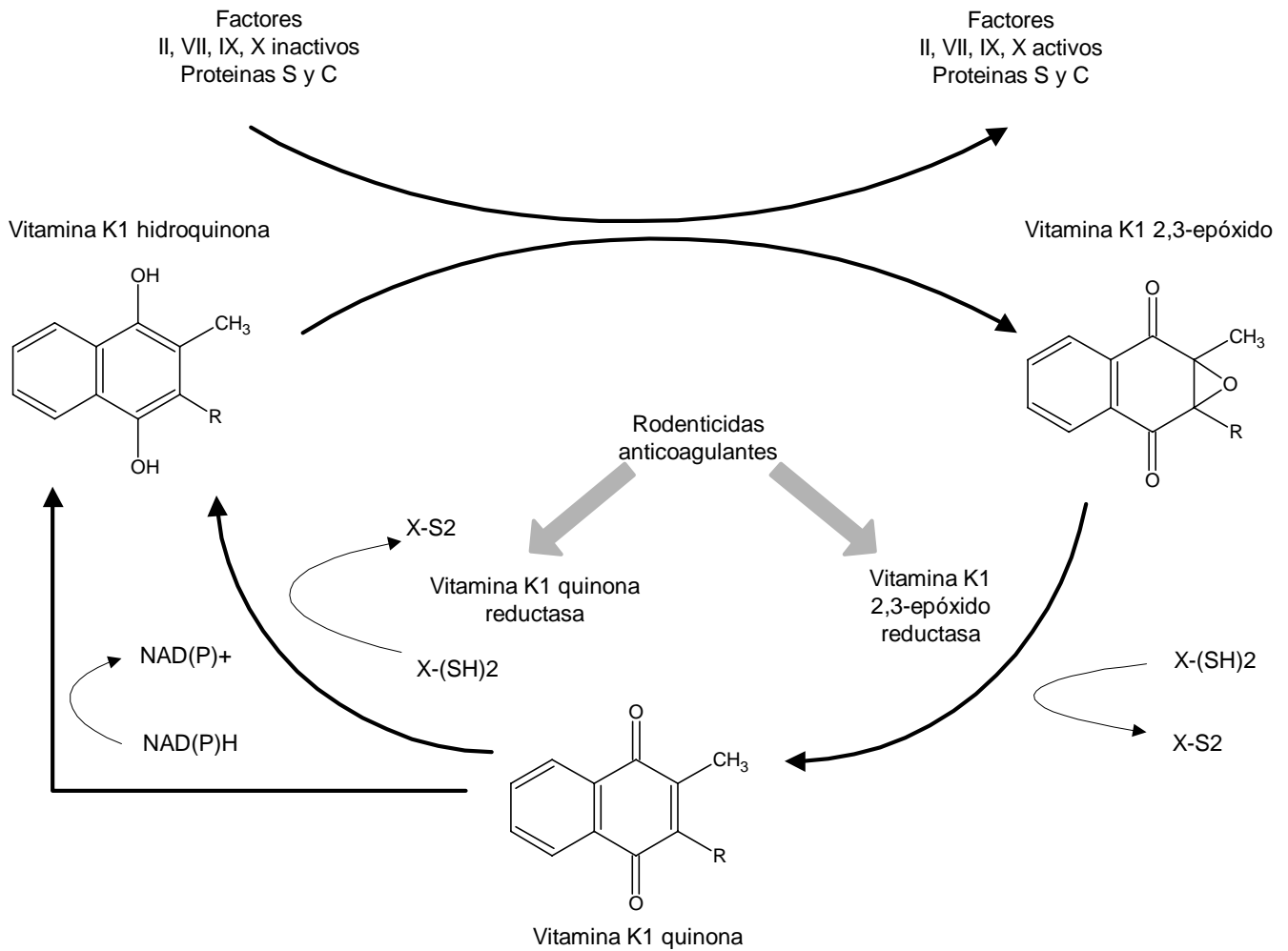


Brodifacoum



Bromadiolone

Figura 2: Sitios de acción de los compuestos rodenticidas anticoagulantes en el ciclo de la vitamina K₁ (modificado de 3).



Recibido: 26/01/06

Aceptado: 06/02/06