

Residuos medicamentosos de diclofenaco y su impacto en los buitres del género Gyps.

Fernando González^{1,2}; Elisa Villén-Molina¹; Irene López¹; Virginia Moraleda¹; Laura Suárez^{1,4}; Samanta Waxman³; Casilda Rodríguez².

¹ GREFA Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat. Ctra. Monte del Pilar s/n, 28220, Majadahonda, Madrid, España.

² Sección Departamental de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

³ Departamento de Anestesiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

⁴ Sección Departamental de Anatomía y Embriología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

Existe una preocupación creciente sobre los efectos de los residuos medicamentosos en el medio ambiente. Concretamente, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), el diclofenaco ha sido el responsable del grave declive poblacional que han sufrido los buitres en el continente asiático al consumir los cadáveres de animales tratados con este AINE. El diclofenaco tiene un amplio uso veterinario por lo que es importante conocer tanto el peligro como el riesgo que supone para estas carroñeras, esenciales para el equilibrio del ecosistema y excelentes centinelas de nuestro medio ambiente. El problema se sitúa en la interfase entre la salud animal y la medioambiental, por lo que presenta una clara orientación “One Health”.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una preocupación creciente sobre los efectos de los residuos medicamentosos en el medio ambiente. Entre ellos se encuentra el diclofenaco, un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) ampliamente utilizado tanto en medicina humana como veterinaria. El diclofenaco está incluido en la Primera Lista de Observación establecida en la Directiva Marco Europea del Agua (Decisión UE 2015/495 y Decisión UE 2018/840), ya que es uno de los residuos medicamentosos más detectados. Aunque las concentraciones suelen ser bajas, cuando son superiores a 1 µg/L pueden alterar el ADN, la respuesta inmune y la reproducción (Boneffille *et al.*, 2018). Hasta el momento, el efecto medioambiental más destacable está relacionado con el consumo por las aves rapaces de la carroña procedente de animales tratados con este AINE. En 2004 se detectó que el fuerte declive poblacional en el sursureste asiático de 3 especies de aves del género Gyps (*Gyps indicus*, *Gyps tenuirostris* y *Gyps bengalensis*) estaba produciéndose por gota visceral aguda que se relacionó con la ingestión de residuos de diclofenaco presente en la carroña (Oaks *et al.*, 2004). Los buitres son aves necrófagas longevas, que tienen una importancia vital en el funcionamiento y en el equilibrio sanitario de los ecosistemas. En España e Italia se encuentran las poblaciones más importantes de buitres de Europa (95% de total de animales censados) y existe preocupación por la existencia de especialidades de uso veterinario conteniendo diclofenaco (Bean *et al.*, 2023). El objetivo de este trabajo es el de revisar la información existente sobre el peligro y riesgo que supone este AINE en aves carroñeras, analizando el riesgo que puede existir con otros AINEs, el porqué de la mayor sensibilidad a los efectos nefrotóxicos en los buitres y sus repercusiones ecológicas.

2. TAXONOMÍA Y SITUACIÓN POBLACIONAL DE LOS BUITRES: ESTATUS DE RIESGO

Los buitres se categorizan en dos linajes filogenéticos que representan una convergencia evolutiva: los buitres del Nuevo Mundo (Fam. *Cathartidae*, 7 especies) y buitres del Viejo Mundo (Fam. *Accipitridae*, 16 especies). Actualmente se les considera uno de los grupos de aves más amenazados, estando 9 especies de buitres en peligro crítico (incluidas las afectadas por los residuos medioambientales del diclofenaco) (IUCN 2023; Ogada 2012; Overvelt *et al.*, 2020). Aunque en Europa y en Norteamérica, tras una larga disminución histórica, actualmente están estables o incluso hay un incremento poblacional, en otras zonas del planeta donde existía una gran población, como es el caso de Asia y África, se está evidenciando un importante declive (Ogada *et al.*, 2012; IUNC, 2023; SEO/BirdLife, 2021). Existen muchas razones para esta disminución, pero las relacionadas con la actividad humana son las más relevantes. Las causas antrópicas pueden ser intencionadas como el envenenamiento y los disparos, o accidentales como la intoxicación por contaminantes ambientales, electrocuciones, ... Además, en el continente africano también influye la caza furtiva de los buitres tanto para elaborar remedios terapéuticos a partir de ciertas partes de su cuerpo (llega a causar el 29% de los fallecimientos) (Boakye *et al.*, 2019) como para servir de alimento (Ogada *et al.*, 2012).

Un punto clave en este descenso poblacional son las intoxicaciones. El envenenamiento de carnívoros, tanto para proteger al ganado como con fines estrictamente cinegéticos, puede terminar intoxicando de forma accidental a especies no diana, como las aves necrófagas, y suponer un riesgo para la salud pública (Ogada *et al.*, 2012). La presencia de estos tóxicos puede originar una intoxicación aguda con una clara sintomatología clínica o bien una exposición crónica a bajas concentraciones, no menos peligrosa, ya que puede terminar originando efectos subletales. Éstos no producen una mortalidad ni morbilidad directa, pero sí pueden ser responsables de una disminución de la supervivencia pues de forma larvada pueden alterar el comportamiento, la respuesta inmune o el éxito reproductivo (González *et al.*, 2017; Nethathe, 2019; Ogada *et al.*, 2012).

3. CARACTERÍSTICAS ECOFISIOLÓGICAS DE LOS BUITRES Y SU REPERCUSIÓN MEDIOAMBIENTAL

Los buitres son uno de los grupos de vertebrados que mayor éxito adaptativo ha tenido en el aprovechamiento de la carroña, ya que son el único grupo terrestre de carroñeros estrictos. Destacan por su eficiencia, en términos de su capacidad para consumir un elevado volumen de carroña a gran velocidad. Los buitres llegan muy rápido y en grandes grupos a las zonas donde se encuentran los animales muertos, logrando consumir el 84% de los cadáveres antes de que aparezca cualquier mamífero carroñero (Ogada *et al.*, 2012).

Su capacidad de recorrer grandes distancias aprovechando las corrientes de aire (más de 100 Km abarcando un área superior a los 10.000 km²), a un coste energético mínimo, y de avistar los cadáveres desde el aire favorecen su elevada eficiencia necrófaga (Moleón *et al.*, 2014). Los buitres localizan fácilmente los cadáveres gracias a un sentido de la vista muy desarrollado, la observación de otros animales, y en algunos casos, como es el de los buitres del Nuevo Mundo, por su gran olfato. A diferencia de las rapaces “cazadoras”, las aves necrófagas tienen los ojos más pequeños, una única fóvea central y un campo visual ampliado que les permiten ver a largas distancias los cadáveres y obtener información de su grupo social (Potier *et al.*, 2020).

La necrofagia es una estrategia ampliamente extendida para mantener el equilibrio medioambiental (Figura 1). Los buitres representan un método efectivo, rápido y barato de eliminar los cadáveres del medio ambiente. En 30 minutos pueden reducir un cadáver hasta los huesos, ayudando al control de la diseminación de enfermedades infecciosas a partir de los tejidos en descomposición (Ogada *et al.*, 2012; Vicente y VerCauteren, 2019). Además, evitan la aparición de otros carnívoros oportunistas. En zonas donde los buitres están prácticamente extinguidos, se aprecia un incremento de especies oportunistas como las ratas y perros asilvestrados, que pueden ser portadores de enfermedades y reservorios primarios de zoonosis. Además, los buitres son menos susceptibles a los efectos potencialmente letales de las toxinas y los patógenos presentes en la materia en descomposición debido a una serie de adaptaciones fisiológicas e inmunológicas, incluido un pH digestivo extremadamente ácido (pH= 1-2) (Ogada *et al.*, 2012; Moleón *et al.*, 2014). El papel de estas especies estaría englobado dentro del concepto “One Health”, ya que limitarían la diseminación de

enfermedades tanto a seres humanos como a especies animales domésticas y salvajes. En algunos países como la India o Nepal, se habla incluso de un impacto sobre la economía local, debido al coste producido por los problemas sanitarios que ocasiona su declive (Nethathe, 2019).

La reducción de la población de buitres en los países del sur asiático tiene también otras connotaciones al haberse limitado el “Entierro del Cielo”, una costumbre de la religión parsi (también practicada por los budistas tibetanos), consistente en un ritual funerario expositorio en el que se deja a los muertos en partes elevadas de la montaña o en la zona abierta de las “Torres de Silencio” a disposición de los carroñeros, especialmente a los buitres que tienen un carácter sagrado en Tíbet, para que se preserven los elementos que conforman el universo (Sanz Mínguez y Rodríguez Gutiérrez, 2013). También tiene un impacto económico en zonas extremadamente pobres de India, ya que usan los huesos de las carcasas consumidas por los buitres para fabricar fertilizantes (Nethathe, 2019).



Figura 1. Buitres comiendo en un muladar (Fotografía cedida por Virginia Moraleda).

4. CARACTERÍSTICAS ADAPTATIVAS QUE PUEDEN INFLUIR EN LA MAYOR SUSCEPTIBILIDAD DEL GÉNERO GYPS AL DICLOFENACO

Los buitres son especies longevas, ubicadas en la parte superior de la cadena trófica, especialmente vulnerables a los contaminantes por sus hábitos alimentarios y características anatómico-fisiológicas, lo que les hace altamente sensibles a su acumulación. Los buitres resisten largos periodos de ayuno en comparación con otras aves, ya que tienen un elevado peso y baja tasa metabólica, por lo que consumen una mayor cantidad de carroña por ingesta. Esto incrementa el riesgo de consumir una mayor cantidad de diclofenaco con cada comida. Aunque su comportamiento puede variar, suelen alimentarse de forma grupal, lo que tiende a provocar la intoxicación de varios animales a la vez (Ogada *et al.*, 2012; Overveld *et al.*, 2020).

Un aspecto importante que puede influir en la diferente susceptibilidad de las especies necrófagas a residuos medioambientales es qué y cómo comen. Entre las distintas especies englobadas en las aves carroñeras, la competencia interespecífica se ha reducido debido a caracteres ecomorfológicos divergentes y jerarquías de dominancia interespecíficas que dan como resultado una partición ordenada de los recursos (Moleón *et al.*, 2014). Los buitres del género *Gyps*, como el buitre leonado, son carroñeros estrictos, que consumen tanto cadáveres frescos como en descomposición. Poseen un cuello largo altamente flexible cubierto de plumas cortas que les permite meter la cabeza fácilmente dentro del cadáver, un pico de borde muy afilado capaz de cortar los tejidos blandos con movimiento rápidos y de extraer el tejido muscular adherido al hueso, y una especie de púas en la lengua que facilitan la ingestión de piezas resbaladizas. Gracias a estas peculiaridades comen

principalmente músculos y vísceras de mamíferos de tamaño medio/grande. Esta preferencia alimenticia les da acceso a órganos de eliminación como el hígado y el riñón que, junto con el punto de inyección, son los tejidos donde se observan los mayores niveles de residuos de diclofenaco (EMA, 2003). Otras aves necrófagas que aparentemente son menos sensibles, presentan hábitos alimenticios que tal vez les predispongan a una menor exposición: los milanos (*Milvus spp.*) son carroñeros facultativos que se alimentan tanto de las presas que cazan como de animales muertos según disponibilidad, el alimoche común (*Neophron pernocterus*), que al tener un pico más débil que los leonados consume partes más blandas y fácilmente accesibles como el músculo, o el quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) que alrededor del 75% de su dieta es ósea (Belver, 2010).

5. PELIGRO Y RIESGO DE LA EXPOSICIÓN AL DICLOFENACO Y OTROS AINE

La amplia presencia de residuos de diclofenaco en los cadáveres de animales tratados con este antiinflamatorio ha sido la responsable de un declive poblacional que ha llevado casi a la extinción a tres especies de buitres del género *Gyps* endémicas del sur y sureste de Asia. Este problema comenzó a notificarse en la década de los noventa del siglo pasado, pero no fue hasta el año 2004 cuando se identificó la relación que existía entre los buitres muertos y este residuo medicamentoso. Tras observar que todos los buitres que habían muerto por gota visceral presentaban residuos de diclofenaco, se reprodujo experimentalmente la muerte por fallo renal asociado a gota visceral en buitres en cautividad alimentados con animales muertos tratados con dosis terapéuticas de este AINE. Hay que tener en consideración que la pauta terapéutica aprobada en vacuno y porcino (2.5 mg/kg/d durante 1-3 d) es entre 11-25 veces más elevada que la DL_{50} en buitres ($DL_{50} = 0.1-0.22$ mg/kg; incluso la dosis de 0.8 mg/kg provoca una alta letalidad) (Swan *et al.*, 2006). En un análisis realizado en 2011, el diclofenaco ocupaba el tercer puesto dentro de los AINE usados a nivel mundial (Rinde, 2019). Este fármaco es peligroso para estas necrófagas, pero es importante conocer el riesgo de exposición.

Escenario asiático

Si nos centramos en analizar el riesgo en el subcontinente indio, en los años en los que comenzó el declive de estos buitres este fármaco era un AINE libre de patente fabricado en India, lo cual abarataba los costes. Se usaba en ungulados domésticos y permitía a

los grupos menos favorecidos económicamente realizar un tratamiento antiinflamatorio y analgésico, haciendo que sus animales pudieran seguir trabajando (Culberth *et al.*, 2011; Oaks y Meteyer, 2012; Rinde, 2019). Además, siguiendo creencias religiosas, los cadáveres de estos animales se dejaban expuestos en la naturaleza (Nethathe, 2019; Sanz Mínguez y Rodríguez Gutiérrez, 2013). En este escenario un AINE, con un alto riesgo de exposición, colocó a las tres especies de buitres del género *Gyps* en peligro crítico de extinción. Se estima que el marcado declive poblacional podría haber sido causado por la contaminación de solo una pequeña proporción de los cadáveres de ungulados a disposición de los buitres (entre 1:130-1:760) (Green *et al.*, 2004).

Con el fin de reducir el riesgo de exposición los gobiernos de India, Pakistán y Nepal prohibieron el uso veterinario de diclofenaco en mayo de 2006 (Cuthbert *et al.*, 2011; Galligan *et al.*, 2020). En los años siguientes a la prohibición, los residuos del diclofenaco todavía eran detectables en el 11% de las carcasas analizadas en el norte de la India (Taggart *et al.*, 2009) y, aunque resultaba alentador el número creciente de especialidades y la elevada disponibilidad del meloxicam para su empleo en veterinaria, resultaba preocupante la continua disponibilidad del diclofenaco. Al parecer, se había logrado saltar la prohibición del uso veterinario del diclofenaco mediante su venta para uso humano y la fabricación ilegal de especialidades veterinarias en bolos para administración oral (Cuthbert *et al.*, 2011). Para evitar el uso fraudulento de estas formulaciones, en 2015 se restringió el volumen máximo de vial para uso humano. Además, conscientes de que la prohibición por sí sola no era suficiente para revertir el problema, se crearon Zonas Santuario y planes de sensibilización de la sociedad (haciendo énfasis en la disponibilidad de una alternativa sostenible para veterinaria como el meloxicam) combinados con un suministro de fuentes de alimento seguras para los buitres (Galligan *et al.*, 2020).

A pesar de que los resultados obtenidos en seguimientos más recientes sobre poblaciones de buitres del Nepal e India pueden ser esperanzadores, ya que muchas áreas han recuperado su población, no se han alcanzado los niveles que existían antes de la crisis. Además, en zonas donde la recuperación es aparentemente total, los cambios de población pueden atribuirse a la migración más que a la recuperación, ya que el éxito de los programas de cría ha sido relativo por el bajo número de pollos y la dificultad de adaptación de las aves criadas en cautividad al ser liberadas (Galligan *et al.*, 2020; Bean *et al.*, 2023).

Además, existen otros AINE disponibles en ese subcontinente que pueden ser peligrosos para el género *Gyps*, como la nimesulida (Galligan *et al.*, 2022) o el aceclofenaco, que en los búfalos tratados se transforma en diclofenaco (Chandramohan *et al.*, 2022). Todo ello podría ocasionar un grave problema, ya que se parte de una densidad demográfica mucho menor que la que existía al final de los años 90 del pasado siglo (Galligan *et al.*, 2020).

Escenario europeo

El diclofenaco está aprobado por la UE desde el 2003 [European Medicine Agency (EMA), 2003]. En España se comercializan dos especialidades desde el 2013 para administración intramuscular en porcino, bovino y equino no destinado a consumo humano. En su ficha técnica se especifica que “*El diclofenaco es tóxico para las aves necrófagas, aunque la baja exposición prevista hace que los riesgos sean bajos*” y en relación con las precauciones de uso en animales se indica “*No administrar a animales susceptibles de entrar en la cadena alimentaria de la fauna salvaje. En caso de muerte o sacrificio de los animales tratados, asegurarse de que no son puestos a disposición de la fauna salvaje*” [Centro de Información de Medicamentos para Veterinaria (CIMAvet), 2022]. El escenario de riesgo en Europa, en principio, parece que no es comparable al asiático. El problema puede derivar de situaciones que se alejen de las condiciones de uso marcadas. Tras la comercialización del diclofenaco en España, Herrero-Villar y colaboradores (2020) han evaluado el riesgo de exposición en la península ibérica analizando diclofenaco y otros AINE tanto en las carcasas de animales de producción que han sido depositados en muladares (cerdos y ovejas, principalmente) como en los cadáveres de casi 400 aves carroñeras estrictas (principalmente buitre leonado) y algunas facultativas. La presencia de residuos detectables de AINE en los cadáveres muestreados en los muladares fue relativamente baja (4% y 3% para ovejas y cerdos, respectivamente), siendo el flunixin el detectado con mayor frecuencia (1.75%) frente a valores de 0.44% para ketoprofeno, meloxicam y diclofenaco. El 3.60% de las aves necrófagas presentaron residuos en hígado y riñón, estando el flunixin en el 1.03% de los casos y el meloxicam, un AINE considerado seguro para buitres, en el 2.57% restante. Esta presencia destacada del flunixin no carece de importancia, dado que es un AINE de uso muy extendido en animales de producción y que también es peligroso para estas carroñeras (Herrero-Villar *et al.*, 2020). En 2014, se relacionó la muerte de un buitre leonado por gota visceral con

la presencia de flunixin en el cadáver (Zorrilla *et al.*, 2014), y en un estudio más reciente también se ha observado la presencia de flunixin compatible con gota visceral y/o daño renal en los cadáveres de tres buitres (0.98% de las aves muestreadas) (Herrero-Villar *et al.*, 2020). Este cuadro se ha reproducido en un zoológico italiano, en el que accidentalmente los buitres alojados fueron alimentados con cadáveres de animales tratados previamente con flunixin (Eleni *et al.*, 2019). Actualmente, en España está autorizado el flunixin meglumine en bovino, equino y porcino, existiendo 13 especialidades para administración intramuscular y 1 en aplicación pour-on para administración transdérmica (CIMAvet, 2022). Cabe señalar por otra parte que no existen especialidades en España, aprobadas para el uso veterinario del aceclofenaco y que otro AINE que también se debería tener en consideración es el carprofeno (Naidoo *et al.*, 2018).

En cuanto al diclofenaco, desgraciadamente en 2020 se ha reportado el primer caso de una necrófaga, un volantón de buitre negro (*Aegypius monachus*), muerta en el nido con gota generalizada y la presencia de diclofenaco en hígado y riñón. El caso fue detectado gracias a que el animal formaba parte de un programa de reintroducción y estaba siendo monitorizado mediante GPS (Herrero-Villar *et al.*, 2021), por lo que otros casos similares podrían pasar desapercibidos. Debemos tener presente que en el último informe publicado por la EFSA (“European Food Safety Authority”) sobre la monitorización de residuos de medicamentos veterinarios realizado en 2020 en muestras de animales vivos o en productos de origen animal, se describe la presencia de niveles de diclofenaco por encima del límite máximo de residuos (LMR) en muestras de vacuno de carne y de leche, de caballos, de porcino y de pollos en varios países de la UE (llegando a afectar al 33% de las muestras en uno de los países evaluados) (Brocca y Salvatore, 2022). Aunque en este informe no se han detectado niveles de este AINE por encima de lo permitido en España, los resultados obtenidos para el conjunto europeo hacen necesaria una vigilancia estrecha de este problema y la implementación de una serie de medidas reguladoras que aseguren en el futuro también en nuestro país la ausencia de casos de intoxicación (Herrero Villar *et al.*, 2021).

6. FARMACOLOGÍA, USO TERAPÉUTICO Y SEGURIDAD DE LOS AINE EN AVES

Las acciones farmacológicas de los AINE se deben principalmente a la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), lo que altera la síntesis de prostaglandinas (PG). Principalmente, existen dos isoformas de esta enzima, COX-1 y COX-2. La primera es una enzima con actividad constitutiva y está implicada en procesos fisiológicos clave. La COX-2 es una enzima inducible que en condiciones basales presenta concentraciones muy bajas en la mayoría de los tejidos. En respuesta a mediadores asociados a la inflamación (citoquinas, endotoxinas, etc.) su actividad se regula rápidamente al alza, jugando un papel clave en la inflamación, el dolor, la fiebre y la proliferación celular normal y patológica (Oaks y Meteyer, 2012; Brenner y Stevens, 2019). Hay que destacar que la COX-2 también se expresa de forma constitutiva en otros tejidos como el cerebro, el pulmón, el timo y el riñón (Bindu *et al.*, 2020). La mayoría de los AINE usados en medicina aviar son no selectivos, si bien el meloxicam y el carprofeno son más potentes frente a la COX-2 que a la COX-1 (Hawkins *et al.*, 2018). En el ser humano, los AINE se usan a dosis que originan una inhibición de la COX-2 mayor del 50% (Bindu *et al.*, 2020). Por ello hay que tener presente que el porcentaje de inhibición de la COX-1, cuando la COX-2 está inhibida al 80%, no alcanza el 20% en el caso de los coxib, es menor del 30 % para el meloxicam y supera el 60% en el caso del diclofenaco (Gan *et al.*, 2010; Bindu *et al.*, 2020). De todas formas, hay que tener en cuenta que el grado de selectividad puede variar entre especies, existiendo un gran vacío de conocimientos al respecto en el caso de las aves. Además, hay que destacar que el efecto adverso más relevante en aves es la nefrotoxicidad y que ambos grupos pueden desencadenarla (Oaks y Meteyer, 2012). Los AINE usados en medicina de aves salvajes/exóticas son carprofeno, celecoxib, diclofenaco, metamizol, flunixin, ibuprofeno, ketoprofeno, meloxicam, fenilbutazona y piroxicam.

En buitres se debe evitar el uso del diclofenaco y, también, de otros AINE como el carprofeno, el flunixin, el ibuprofeno y la fenilbutazona por su potencial nefrotoxicidad. El meloxicam es considerado actualmente el más seguro para todas las especies aviares, destacando como reacciones adversas la congestión glomerular y la degeneración tubular leve y reversibles en periquitos (*Melopsittacus undulatus*), la lipidosis hepática a dosis elevadas en cernícalos (*Falco sparverius*) y úlceras gástricas casi en el 20% de los animales tratados. Incluso dentro de las aves

carroñeras la sensibilidad a los efectos tóxicos por la exposición a residuos de diclofenaco varía. Destaca el caso de los jotes (*Cathartes aura*), buitres del Nuevo Mundo que no manifiestan signos de toxicidad tras la administración de dosis que oscilan entre 0.08 y 25 mg/kg (Rattner *et al.*, 2008). Entre los carroñeros facultativos existe una ausencia de toxicidad a dosis que oscilan entre 0.8 y 10 mg/kg en el cuervo pío (*Corvus albus*) (Naido *et al.*, 2011); sin embargo, otras especies de la Familia Accipitridae, como el águila esteparia (*Aquila nipalensis*), han fallecido tras la exposición a residuos medioambientales del diclofenaco (Sharma *et al.*, 2014). Otros grupos aviares que no son necrófagos, como las gallinas, las palomas, las codornices y los minás (*Acridotheres tristis*), muestran una sensibilidad variable a este AINE. La codorniz y el miná son especies más resistentes a la administración oral de diclofenaco ($DT_{min}=10$ mg/kg: 10% mortalidad para ambos; siendo DL_{50} de 405 mg/kg para la codorniz) que la gallina ($DT_{min}=2.5$ mg/kg: 30% mortalidad) (Hussain *et al.*, 2008). Aparentemente las palomas son las que manifiestan un comportamiento más errático, bien más cercanas a los buitres ($DT_{min}=0.25$ mg/kg: 20% mortalidad) (Hussain *et al.*, 2008) o muy resistentes, ya que ninguna paloma doméstica falleció con las dosis administradas (Hassan *et al.*, 2018). Posiblemente influyó la regurgitación del contenido digestivo descrita tras el sondaje oral ya que las palomas regurgitan el contenido del buche para alimentar a sus pichones (Rodríguez *et al.*, 2017). Los patos de producción aparentemente son resistentes ($DL_{50}=190$ mg/kg) (Hassan *et al.*, 2018).

7. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA RENAL EN LAS AVES

El riñón de las aves es aplanado, sin distinción clara entre la zona cortical y medular, y presenta tres divisiones (craneal, media y caudal). Las aves carecen de vejiga de la orina por lo que el fluido formado en los riñones se vierte directamente en la zona de la cloaca denominada urodeo (Rodríguez *et al.*, 2017). En los mamíferos, el único órgano de osmorregulación es el riñón; sin embargo, las aves, al tener un riñón con una menor capacidad para concentrar la orina (cociente osmolar orina/plasma: aves =2.0-2.5; mamíferos = 25-30) recurren al intestino grueso y, en algunas especies, a las glándulas salinas para regular el volumen de agua corporal (Braun, 2015). Así, cuando existe una privación de agua, el fluido que llega a la cloaca pasa mediante movimientos retroperistálticos hacia los tramos finales del intestino, donde se realiza la reabsorción de agua y sales (Braun, 2015; Rodríguez *et al.*, 2017).

En mamíferos la urea es el producto principal con el que se excretan los compuestos nitrogenados y la cantidad de ácido úrico (AU) que producen es mucho menor. En general, consiguen el mantenimiento de la homeostasis de los uratos gracias a la secreción y reabsorción que se produce en el túbulo contorneado proximal (TCP) mediante numerosos transportadores. Sin embargo, las aves presentan unos niveles de AU muy elevados, que se producen principalmente en el hígado como producto final del metabolismo de las purinas y se excretan por el riñón mediante secreción tubular (80%) y en menor medida mediante filtración. En estas especies, la necesidad de eliminar grandes cantidades de ácido úrico, que superan las obtenidas mediante filtración, justifica la **ausencia de reabsorción** (carecen del transportador URAT1) de AU a nivel tubular (Rodríguez *et al.*, 2017; Nethathe *et al.*, 2021b). La secreción unidireccional de uratos de las células tubulares renales aviares se lleva a cabo gracias al esfuerzo coordinado de los transportadores de aniones (OAT) localizados en la membrana basolateral y el transportador de membrana dependiente de ATP (MRP4), localizado en la porción apical de la membrana, que facilitan la salida de los uratos a la luz tubular (Bataille *et al.*, 2008; Barik *et al.*, 2019; Nethathe *et al.*, 2020). Como el AU y su sal pueden precipitar fácilmente en un medio acuoso y las concentraciones que alcanzan en el TCP superan el límite de solubilidad, para evitar la formación de cristales a nivel luminal se unen los uratos a la albúmina formando unos elementos esféricos (compuestos en un 65% por uratos). La orina ureteral aviar contiene una concentración de proteínas en orina 100 veces mayor que los mamíferos domésticos, debido a que la barrera de filtrado glomerular tiene un epitelio fenestrado con mayor tamaño de poro y una carga aniónica menor (Braun, 2015). El AU, además de necesitar un menor aporte de agua para su excreción (la orina de las aves es blanquecina y de consistencia cremosa), tiene una menor toxicidad para el embrión aviar que la urea y representa una eficaz defensa antioxidante pudiendo actuar como agente quelante y neuroprotector (Settle *et al.*, 2012).

Nefronas de tipo reptiliano y mamífero. Las aves tienen dos tipos de nefronas: reptilianas y mamíferas. En la región cortical se encuentran un gran número de nefronas pequeñas reptilianas, que son las que carecen de asa de Henle. Las otras nefronas son las de tipo mamífero, su porcentaje es minoritario (15%) y comprende dos variedades: las de asa corta y de asa larga. Están localizadas más profundamente en el córtex y llegan a la zona medular. La zona medular del riñón está formada por los conos medulares que contienen

las asas de Henle, tubos colectores y los vasos rectos renales (Frazier *et al.*, 1995; Braun, 2015).

Vascularización renal arterial. Depende de tres ramas separadas que proceden de la aorta y terminan irrigando cada lóbulo renal. Hay ramas de la arteria renal que dan lugar a las arterias interlobulares, que se dividen en diferentes arteriolas aferentes que entran en la cápsula de Bowman (Frazier *et al.*, 1995). El ovillo o penacho glomerular del riñón aviar difiere de forma importante del de los mamíferos. El típico glomérulo de los mamíferos es una red de capilares altamente anastomótica; en cambio, en las nefronas reptilianas generalmente hay una única rama capilar plegada en el interior de la cápsula de Bowman. Después de formar los capilares glomerulares, los vasos salen de la cápsula como arteriolas eferentes, y forman una red capilar alrededor del túbulo renal (capilares peritubulares) (Braun, 2015; Rodríguez *et al.*, 2017).

Los capilares de las aves que forman los penachos glomerulares tienen un diámetro interior mayor que los de los mamíferos, en consonancia con el mayor tamaño de los glóbulos rojos que, además, son de forma oval/fusiforme, nucleados y de menor longevidad que los de mamíferos, posiblemente debido a su mayor metabolismo (Matos y Morrissey, 2022). La tasa de filtración glomerular (TFG) es menor en las nefronas de tipo reptiliano por lo que si se compara con la de mamíferos de masa corporal similar, las aves tienen una menor TFG individual; sin embargo, esto se compensa con un mayor número de nefronas de forma que la tasa glomerular renal total es similar. La filtración glomerular en aves es variable e intermitente y depende del estado de hidratación. Cuando existe privación de agua o el ave está expuesta a factores estresantes, la TFG se reduce hasta un 65% (Braun, 2015). En esas circunstancias el sistema porta renal es el que se encarga de mantener la perfusión de los túbulos renales tratando de evitar una necrosis isquémica (Dzialowski y Crossley, 2015).

Sistema porta renal. Al igual que otras especies no mamíferas, el riñón de las aves también es perfundido por **sangre venosa** del sistema porta renal. Las venas porta renales surgen de las venas iliaca externa o isquiática, la caudal, la coccígea y la mesentérica (Figura 2). Los capilares de la vena porta renal rodean los túbulos de las nefronas reptilianas y se anastomosan con las arteriolas eferentes (Braun, 2015). Por ello, el riñón de las aves recibe una irrigación sanguínea aferente dual, vía arteria renal y vía porta renal (Blackburn y Prashad, 1990). El flujo de sangre al riñón desde los vasos porta renales está controlado por una válvula de músculo liso

ubicada en la vena íliaca común y regulada por el sistema nervioso autónomo. Se acepta que bajo influencia adrenérgica la válvula permanece abierta y permite el paso de la sangre hacia el resto del organismo a través de la vena cava caudal, evitando su paso por el riñón; en cambio, el estímulo colinérgico induce el cierre de la válvula, de manera que la sangre se dirige hacia el parénquima renal por las venas porta renales (Oelofsen, 1971; Frazier *et al.*, 1995; Meteyer *et al.*, 2005; Oaks y Meteyer, 2012; Rodríguez *et al.*, 2017).

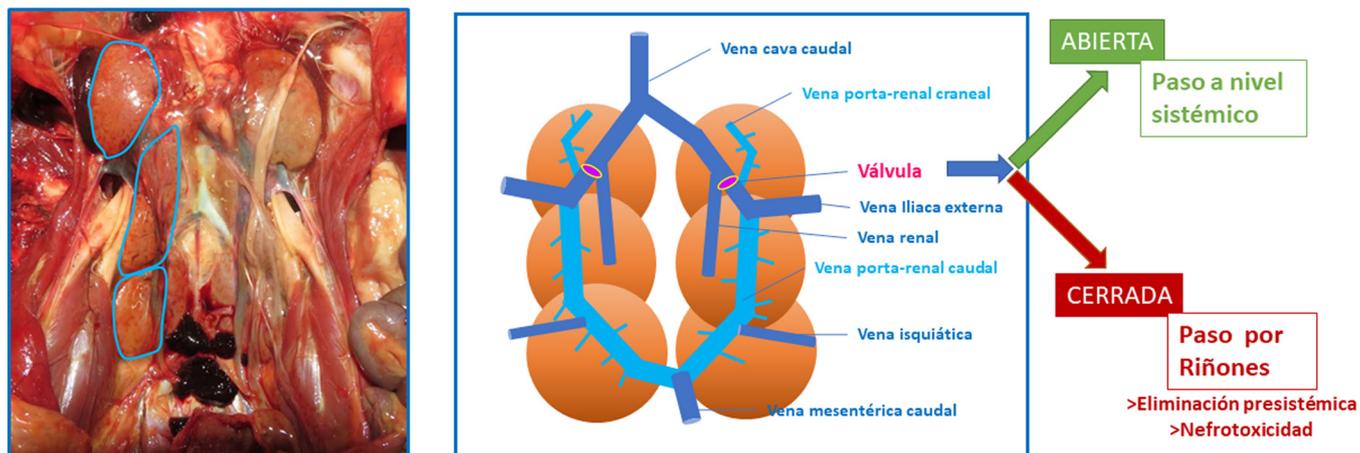


Figura 2. Disposición de los tres lóbulos renales en un cadáver de buitre leonado y esquema de la perfusión venosa del riñón con la participación del sistema porta renal en la distribución de la sangre (ver el texto).

Sistema Renina Angiotensina. En la hemodinámica renal de muchas especies de vertebrados tiene una gran relevancia el sistema renina angiotensina (SRA), que ha evolucionado de forma cercana en los mamíferos, las aves y los reptiles. Este sistema se activa cuando existe una depleción de volumen; sin embargo, en las aves existe una menor activación de SRA en presencia de hipovolemia o hipotensión (Butt-Hussaim y Manitius, 2021). La angiotensina II (AGTII) causa un incremento de la presión sanguínea en las especies vertebradas más representativas, bien directamente por producir vasoconstricción o indirectamente estimulando la secreción de catecolaminas de las terminaciones nerviosas adrenérgicas y las células cromafines de la médula adrenal (Butt-Hussaim y Manitius, 2021). En las aves **los efectos vasopresores de la AGTII se atribuyen únicamente a la estimulación de la secreción de catecolaminas** (Butt-Hussaim y Manitius, 2021; Dzialowski y Crossley, 2015). La vasoconstricción mediada por la activación simpática se produce en ambas arteriolas, pero el efecto vasoconstrictor sobre la arteriola eferente es superior al producido sobre la aferente, debido a que en esta última está amortiguado por el aumento compensatorio de las PGE_2 e I_2 y óxido nítrico (Braun, 2015; Dzialowski y Crossley, 2015).

8. PATOLOGÍA PRODUCIDA POR EL DICLOFENACO EN BUITRES

La exposición al diclofenaco origina un proceso agudo y grave. En los buitres silvestres fallecidos tras la ingesta de diclofenaco se observan depósitos de uratos en las vísceras de la cavidad celómica, especialmente en el riñón, el corazón, el hígado y el bazo (Figura 3). A nivel renal se aprecia una necrosis tubular aguda, que afecta a los TCP del córtex renal (Oaks y Meteyer, 2012; Oaks *et al.*, 2004; Meteyer *et al.*, 2005). Por el contrario, los túbulos contorneados distales (TCD) y los colectores están relativamente intactos en los estadios iniciales de la exposición; sin embargo, según avanza el proceso, las lesiones se agravan y terminan alterando toda la estructura renal debido a la formación de grandes depósitos de agregados de uratos. Esto puede deberse a que la necrosis que se produce en los túbulos va acompañada de la precipitación de uratos en forma de cristales. El incremento del tamaño, el número y la distribución de esos agregados amorfos (tofus gotosos), son un reflejo de la progresión de la enfermedad. Por otra parte, en lesiones avanzadas se aprecia que los TCD y los colectores están dilatados y contienen detritus y material eosinofílico. La respuesta inflamatoria que se

observa en las carroñeras fallecidas es mínima y suele asociarse a la presencia de tofos gotosos (Meteyer *et al.*, 2005). La necrosis del TCP origina una disminución del aclaramiento tanto del diclofenaco como del ácido úrico, lo que termina conduciendo a fallo renal, acidosis, hiperkalemia y fallo cardiaco, letal para el buitre (Oaks y Meteyer, 2012). El diclofenaco también puede producir a dosis muy elevadas la muerte en pocos minutos, sin estas evidencias histológicas, como se ha descrito en gallináceas (Locke *et al.*, 2022).

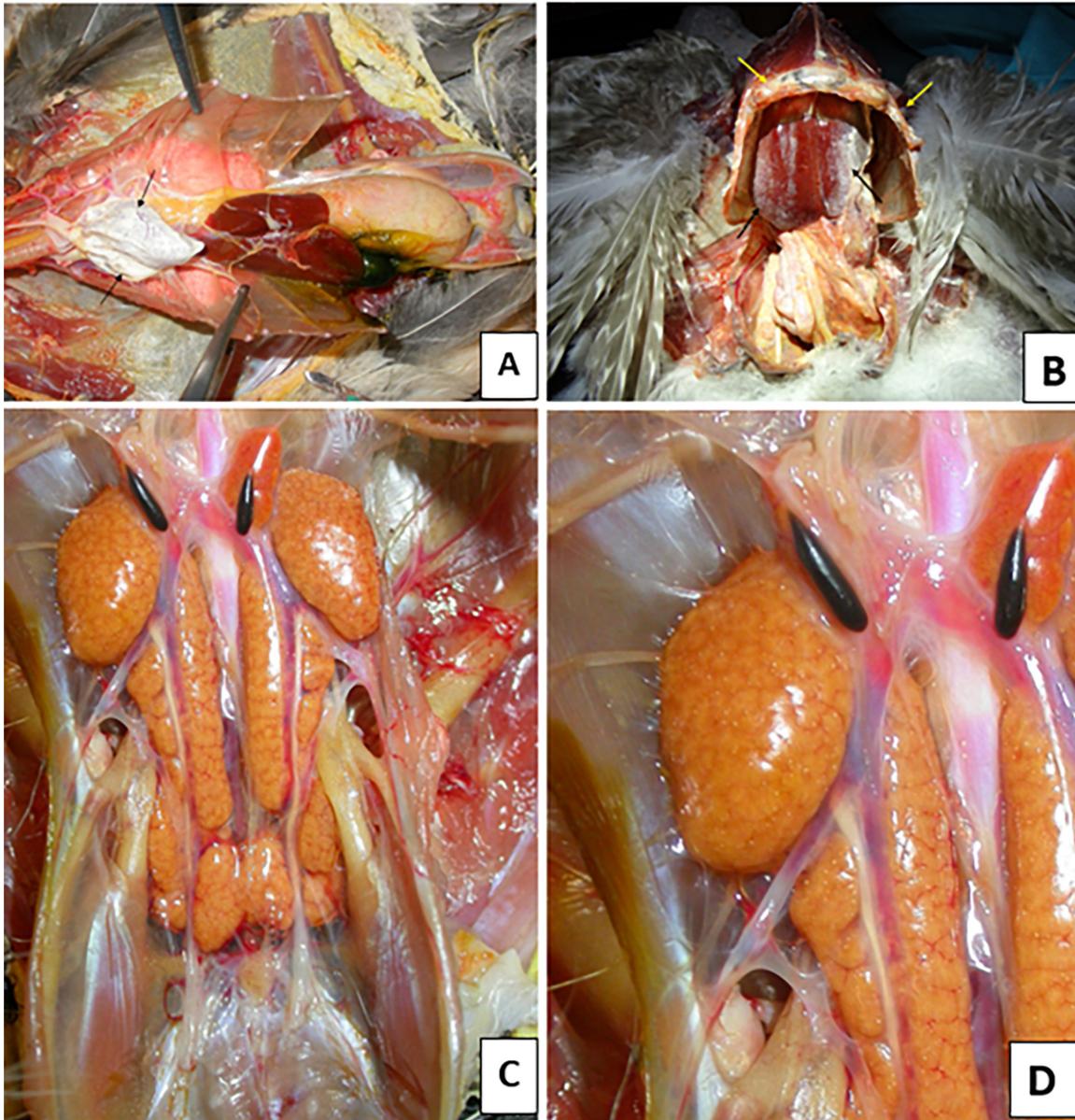


Figura 3. Lesiones asociadas a la gota visceral en diferentes especies de aves. (A) Pericardio engrosado y muy adherido al miocardio debido a los depósitos de cristales de ácido úrico (flechas negras). (B) Depósitos de ácido úrico en la parte externa de la quilla (flechas amarillas) y superficie hepática (flechas negras). (C y D) Imágenes de los riñones y detalle del parénquima renal donde se aprecia un punteado blanquecino sobre toda su superficie, ocasionado por la precipitación de los uratos. (Fotografías cedidas por GREFA).

9. MECANISMOS DE TOXICIDAD DE LA EXPOSICIÓN AL DICLOFENACO EN LOS BUITRES

Son varias las hipótesis que se han planteado para tratar de explicar por qué el diclofenaco produce estas alteraciones en los buitres del género *Gyps* y por qué estas aves tienen una susceptibilidad mayor que otras especies. Cabe pensar además que sean varios los mecanismos implicados y los factores predisponentes que de forma combinada terminen originando los efectos tóxicos (Figura 4).

• MECANISMO VASCULAR CON LA PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA PORTA RENAL

Se ha propuesto que la inhibición del efecto modulador de PG sobre la estimulación adrenérgica mediada por AGTII estaría en el origen de la toxicidad renal del diclofenaco (Meteyer *et al.*, 2005). La vasoconstricción mediada por AGTII en mamíferos es modulada por la liberación compensatoria de PGE₂ y PGI₂ a nivel renal, que **actúan favoreciendo la vasodilatación de la arteriola AFERENTE** y por tanto disminuyen la resistencia preglomerular para que se mantenga la TFG, especialmente cuando existe una depleción de fluidos (Meteyer *et al.*, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2019; Bindu *et al.*, 2020). Al ser el diclofenaco un potente inhibidor de la síntesis de PG, podría anularse ese efecto protector, lo que favorecería la vasoconstricción y la consecuente reducción de la perfusión del córtex renal, conduciendo a la isquemia y la necrosis tubular observada en buitres (Meteyer *et al.*, 2005; Nethathe *et al.*, 2021a).

Como la afectación renal por el diclofenaco comienza con una necrosis selectiva de los túbulos renales a nivel cortical, una de las primeras hipótesis planteó la implicación del **sistema porta renal**, que es responsable de su irrigación junto con la sangre que procede del glomérulo a través de la arteriola eferente. Mas concretamente, la apertura de la **válvula** del sistema porta renal en respuesta a una estimulación adrenérgica secundaria al aumento de AGTII podría contribuir a la reducción de la perfusión renal (Meteyer *et al.*, 2005; Oaks y Meteyer, 2012).

• ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL Y CITOTOXICIDAD

Otra de las teorías patogénicas está relacionada con el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Oaks y Meteyer, 2012). Los AINE pueden producir estrés oxidativo mitocondrial, al actuar sobre el complejo I de la cadena de transporte electrónico, comprometiendo la

síntesis de ATP. En consecuencia, el diclofenaco puede inducir apoptosis de las células renales y la regulación al alza de citocinas proinflamatorias, lo que favorecería la aparición de un fallo renal agudo (Bindu *et al.*, 2020). En cultivos de células renales de mamíferos el diclofenaco es más tóxico que el meloxicam y las células del TCP son más sensibles a los efectos tóxicos de ambos AINE que las del TCD (Ng *et al.*, 2008). Estas observaciones podrían dar cuenta de la diferente toxicidad de estos dos AINE y de la zona en la que predominantemente se producen las lesiones, pero no las posibles diferencias entre mamíferos y aves. Para poder contestar esta pregunta se realizó un estudio comparativo de ambos AINE sobre cultivos de células tubulares renales establecidos a partir de riñones extraídos de cadáveres de gallina y de buitre (Naido y Swan, 2009a). La citotoxicidad de los dos AINE es mayor (> de 100 veces) sobre las células renales de gallina que sobre las de mamíferos; sin embargo, inesperadamente, el meloxicam fue más tóxico que el diclofenaco. Sí resulta más acorde con los efectos clínicos de ambos fármacos la influencia del tiempo de exposición, ya que tras 2h de exposición sólo es tóxico el diclofenaco, siendo necesarias 12h de incubación para que se produzca el incremento de ROS (Naido y Swan, 2009a).

• ALTA ACTIVIDAD METABÓLICA DEL TCP

Las células del TCP, en comparación con las del TCD o del colector, poseen una tasa metabólica elevada ya que son las principales encargadas de la reabsorción de solutos en la nefrona. Por ello, presentan una gran abundancia de mitocondrias, que forman el ATP necesario para que funcionen adecuadamente los transportadores, y un alto requerimiento de oxígeno (Gewin, 2021). Ello condicionaría que las células del TCP sean especialmente vulnerables a la hipoxia y, consiguientemente, más susceptibles de experimentar la necrosis isquémica y/o citotóxica.

• TRANSPORTE Y PRECIPITACIÓN DE URATOS

Tras la necrosis de las células del TCP se produce rápidamente la precipitación de los uratos, ya que es la zona donde se excreta la mayor parte del AU que se origina en el organismo. Las aves, al ser organismos uricotélicos, producen concentraciones de uratos muy elevadas (Braun, 2015), por lo que un déficit en su eliminación agravaría la respuesta tóxica originada por este AINE. El importante papel del AU en este proceso ha servido también de punto de partida de otra de las hipótesis, que se ha centrado en las posibles diferencias que pueden existir en los transportadores de aniones

que participan en la excreción del AU (Nethathe, 2019; Nethathe *et al.*, 2021b). Recientemente se ha realizado la caracterización molecular del transportador OAT2 en *Gyps africanus* y determinado su interacción con el diclofenaco, habiéndose propuesto que la toxicidad que induce podría deberse a la unión alostérica con este transportador (Nethathe *et al.*, 2021b).

Es de señalar que la secuencia genética del transportador de aniones orgánicos OAT1 y OAT2 del *Gyps africanus* presentan una semejanza del 98% con los del águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*), posiblemente debido a su cercanía taxonómica, ya que ambas especies pertenecen a la familia *Accipitridae*. En base a esta analogía y a que el águila esteparia es

la única especie no carroñera estricta que ha padecido los efectos tóxicos medioambientales del diclofenaco (Sharma *et al.*, 2014), se sospecha que otras aves de esta familia pueden ser también susceptibles a su toxicidad. Si se realiza una comparación con gallináceas, parece que existe una ligera diferencia en la expresión del transportador OAT2, que según los autores podría influir en la diferente sensibilidad al diclofenaco entre gallináceas y buitres. Adicionalmente se ha descrito variantes en buitres (*Gyps himalayensis*) de otro transportador de aniones del túbulo renal, el MRP4, que podría también estar implicado en una menor excreción de diclofenaco y consiguientemente en la acumulación y mayor toxicidad del mismo en estas necrófagas (véase el epígrafe siguiente) (Barik *et al.*, 2019).

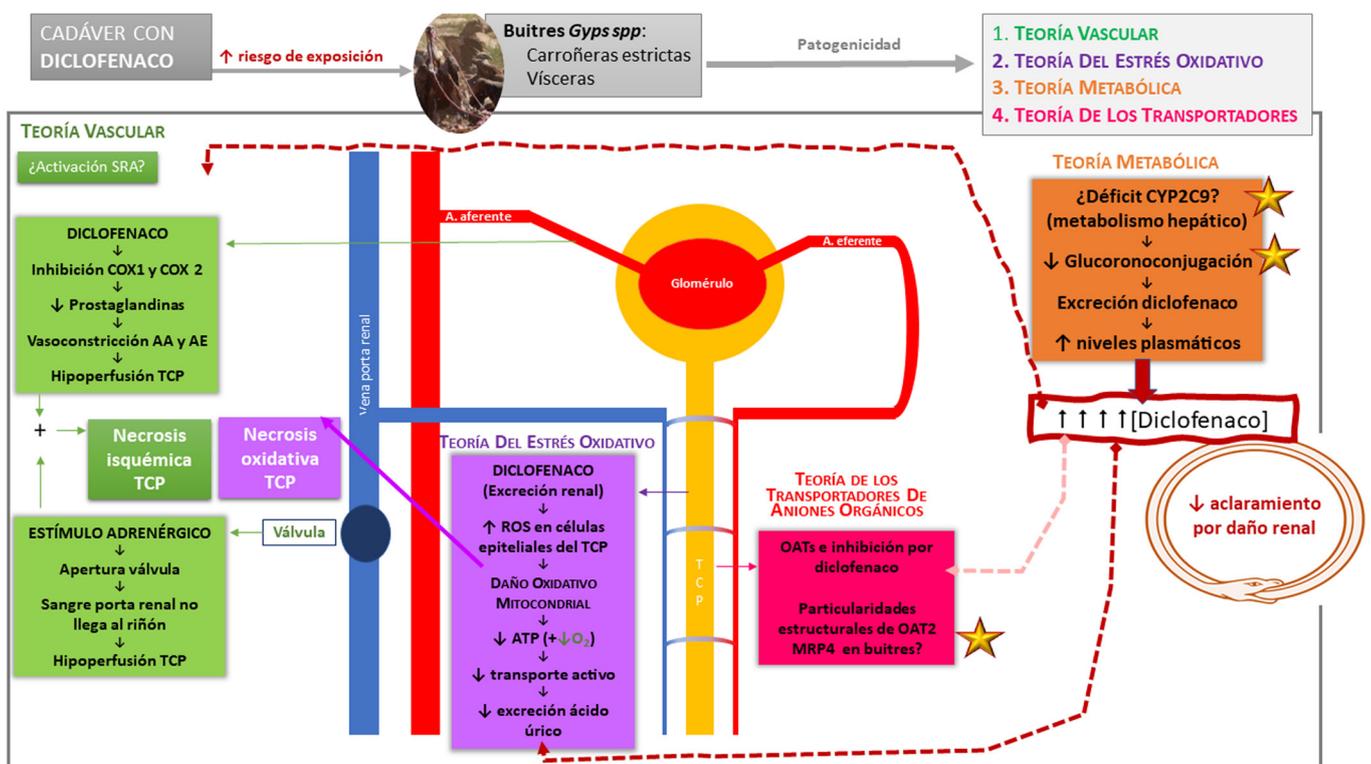


Figura 4. Mecanismos y factores posiblemente implicados en la patogenicidad de la lesión renal inducida por diclofenaco en buitres del género *Gyps*. Las estrellas marcan las particularidades que pueden contribuir a la sensibilidad mostrada por los buitres (ver el texto).

• FARMACOCINÉTICA COMPARADA: DIFERENCIAS EN EL METABOLISMO

Es muy escasa la información de tipo farmacocinético sobre el diclofenaco en aves. Concretamente, sólo se ha realizado un estudio en dos especies de buitres africanos, con dos ejemplares de buitre del cabo (*Gyps coprotheres*) en los que se empleó la vía IV y dos ejemplares de buitre dorsiblancos (*Gyps africanus*) a los que se les administró PO. Evidentemente, la elevada toxicidad potencial del compuesto y el valor ecológico de estas especies explica el uso de una muestra tan pequeña. Si comparamos con la gallina, en buitre se aprecia una mayor biodisponibilidad, con un aclaramiento mucho menor y mayor semivida de eliminación [carroñeras: *Gyps coprotheres* (0.8 mg/kg,

IV), $t_{1/2e} = 12.24$ h y *Gyps africanus* (0.8 mg/kg; PO), $t_{1/2e} = 17$ h; *Gallus gallus* (0.8 mg/kg, PO), $t_{1/2e} = 0.9$ h] (Naidoo *et al.*, 2007; Naidoo *et al.*, 2009b; Swan *et al.*, 2006). Un comportamiento farmacocinético similar al de la gallina se observa en otra carroñera facultativa, el cuervo pío, que presentan una semivida de eliminación de unas 3 h cuando el diclofenaco se administra PO a la dosis de 10 mg/kg (Naidoo *et al.*, 2011). En otros estudios realizados en codornices, patos y palomas se observan permanencias de 6.7h, 1.6h y 3.5h, respectivamente, sin que su comportamiento farmacocinético se relacione con la DL_{50} obtenida en esas especies (Hussain *et al.*, 2008), que en todas ellas es muy superior a la observada en buitres. La eliminación también es mucho más rápida en la oveja (1 mg/kg, IV: $t_{1/2e} = 2$ h). Todo ello condiciona una mayor permanencia en el organismo y concentraciones más elevadas en las aves carroñeras que en otras especies aviares o mamíferas. Estas diferencias también se reflejan en los residuos tisulares de diclofenaco, que estaban presentes en la mayoría de los órganos de los buitres y casi completamente ausentes en las gallinas (Naidoo *et al.*, 2007).

En humanos, al igual que en otras especies mamíferas, el diclofenaco se metaboliza de forma significativa en el hígado y se elimina bien biotransformándose directamente a metabolitos conjugados (glucurónico y sulfato principalmente) o bien originando metabolitos de fase I mediante la participación de enzimas de la familia CYP (hidroxilados y carboxilados), que posteriormente se conjugan (Bindu *et al.*, 2020). En la mayoría de las especies mamíferas, posee una gran importancia la excreción urinaria del diclofenaco, aunque principalmente en forma de metabolitos (EMA 2003), lo que puede resultar en una elevada exposición de este tejido a este AINE (Oaks y Meteyer, 2012).

En los buitres podría existir un déficit enzimático que origine un metabolismo de orden cero para el diclofenaco, que justifique su lenta eliminación en carroñeras (Naidoo *et al.*, 2010). El buitre del cabo (*Gyps coprotheres*) tiene una concentración de enzimas CYP hepáticas menor que los mamíferos (<11-55%); sin embargo, es similar a la observada en aves de los órdenes Passeriformes, Galliformes, Pelecaniformes y Charadriiformes (Adawaren *et al.*, 2018). Una de las **enzimas del citocromo P450 (CYP)** que es relevante en el metabolismo del diclofenaco en personas es la **CYP2C9**. Su inhibición con fluconazol, potente inhibidor de esta enzima humana, aparentemente no modifica ni la respuesta tóxica ni los parámetros farmacocinéticos del diclofenaco en gallinas. Pero sí se aprecia que hay una menor cantidad de metabolitos hidroxilados

en el grupo con inhibición metabólica, especialmente en las aves que han fallecido (Locke *et al.*, 2022), lo que determinaría una mayor exposición al diclofenaco (mayor AUC y C_{max}). También se ha argumentado un déficit de **conjugación con glucurónico como causante de** la toxicidad del diclofenaco en el buitre. Sin embargo, se ha demostrado que sí pueden hacerlo con el meloxicam (Naidoo *et al.*, 2008).

• REFLEXIÓN GLOBAL

El diclofenaco, al igual que otros AINE, es potencialmente nefrotóxico tanto en mamíferos como en aves. No obstante, la relación beneficio/riesgo es asumible para los mamíferos, dado que la dosis a la que produce toxicidad permite un margen de seguridad adecuado para su uso terapéutico. No ocurre lo mismo para muchas especies aviares. En general, la mayor sensibilidad a los fármacos nefrotóxicos en aves que en los mamíferos es más fácil de explicar por las diferencias anatómico-fisiológicas entre ambas clases de animales, que las diferencias en sensibilidad entre los distintos taxones de la clase Aves, debido a una gran falta de información.

En la patogénesis de la intoxicación por diclofenaco podría estar implicado un evento inicial, que actuando como desencadenante, produjese el cuadro que se observa en los buitres al asociarse con múltiples factores concomitantes. Entre estos podría encontrarse un déficit metabólico que reduzca la eliminación de diclofenaco, lo que produciría niveles más elevados y persistentes del fármaco en el organismo. En seres humanos, la exposición a dosis elevadas, supraterapéuticas, causa fallo renal agudo (Bindu *et al.*, 2020). Sin embargo, las concentraciones alcanzadas con dosis subterapéuticas de mamíferos son claramente tóxicas para estas carroñeras. Estas altas concentraciones de diclofenaco en el organismo posiblemente causen una fuerte inhibición tanto de la COX1 como de la COX2, ambas constitutivas en el riñón. Las PG son fundamentales en la regulación de la hemodinámica renal y la TFG. Se ha pensado que además podría existir una situación o mecanismo que induzca la activación del SRA, con la consecuente vasoconstricción renal. La deshidratación, aunque puede no desempeñar un papel causal, es claramente un factor agravante de la lesión renal al favorecer la precipitación de los uratos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el tratamiento con diclofenaco puede producir nefrotoxicidad incluso en pacientes con una función renal adecuada (Douros *et al.*, 2018), hecho que también se produce en buitres aparentemente sanos expuestos a diclofenaco.

Es probable que la lesión renal se deba a una necrosis tanto isquémica (por vasoconstricción) como oxidativa en el TCP, zona altamente vulnerable por sus elevados requerimientos de oxígeno. Inmediatamente, tras la lesión de las células del TCP (esenciales en la eliminación del AU) se produce hiperuricemia y precipitación de uratos.

Podemos plantearnos **por qué el diclofenaco y otros AINE** como el flunixin (Zorrilla *et al.*, 2014), el ketoprofeno (Naidoo *et al.*, 2010) o la nimesulida (Galligan *et al.*, 2022) pueden ser lesivos en los buitres y no el meloxicam. Un factor a tener en cuenta sería la selectividad COX-1/COX-2, dado que el diclofenaco es un AINE no selectivo, a diferencia del meloxicam que posee una capacidad 5-50 veces mayor para inhibir la COX2. Sin embargo, esta menor selectividad sobre la COX-2 también se aprecia para el flunixin y el ketoprofeno (Warner *et al.*, 1999; Beretta *et al.*, 2005; Bindu *et al.*, 2020) pero no para la nimesulida, lo que determinaría que este factor no tuviera una importancia determinante de la toxicidad renal.

El porqué de la **mayor sensibilidad de los buitres del género Gyps**, seguramente esté relacionada con una mayor exposición de las células renales debido a la lenta eliminación del fármaco, pudiendo estar implicada las enzimas CYP como la CYP2C9 y/o ciertas particularidades en los transportadores y en la producción de ROS. Como cabe deducir de las anteriores consideraciones, queda todavía un largo camino por recorrer para establecer el peso relativo que tiene cada uno de esos factores en la especial susceptibilidad de los buitres.

CONCLUSIÓN

Los efectos de un residuo medicamentoso de diclofenaco han producido un daño medioambiental importante en los buitres del género Gyps, que son extremadamente sensibles a los efectos tóxicos de este AINE. Aunque está demostrada su peligrosidad para los buitres, persiste la incertidumbre sobre el riesgo asociado al uso de otros AINE de uso veterinario que pueden acabar disponibles en la cadena alimentaria de las mayores necrófagas terrestres, especies aviares fundamentales para el equilibrio del ecosistema en el escenario europeo. A este respecto, España es un referente “poblacional” de los buitres del Viejo Mundo y, consiguientemente, debe serlo también en la monitorización de los efectos medioambientales de estos medicamentos veterinarios. Se hace por tanto necesario mantener el esfuerzo por controlar el riesgo asociado a los mismos al tiempo que se avanza en la comprensión del mecanismo de toxicidad del diclofenaco para evitar que se produzcan problemas similares por fármacos nuevos o antiguos.

REFERENCIAS

1. **Adawaren EO, Du Plessis M, Suleman E, Kindler D, Oosthuizen AO, Mukandiwa L, Naidoo V.** The complete mitochondrial genome of Gyps coprotheres (Aves, Accipitridae, Accipitriformes): phylogenetic analysis of mitogenome among raptors. *Peer J*, 2020; 8: e10034
2. **Barik S, Saini M, Rana M, Gupta PK.** Multidrug resistance protein 4 (MRP4) is expressed as transcript variants in both Gallus domesticus and Gyps himalyanesis *Gene*, 2019; 689:172-182.
3. **Bataille AM, Goldmeyer J, Renfro JL.** Avian renal proximal tubule epithelium urate secretion is mediated by MRP4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008; 295: R2024-33.
4. **Bean TG, Chadwick EA, Herrero-Villar M, Mateo R, Naidoo V, Rattner BA.** Do Pharmaceuticals in the Environment Pose a Risk to Wildlife? *Environ Toxicol Chem*, 2023; 00: 1-16.
5. **Belver Mateo, A. 2010.** Construcción de un punto de alimentación de aves necrófagas con equipamiento de observación en el término municipal de Loporzano (Huesca). Colección Escuela Técnica Forestal Universidad de Lleida. Acceso 15 de mayo de 2022. <https://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/45897/Belver.pdf?sequence=1>

6. **Beretta C, Garavaglia G, Cavalli M.** COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: an in vitro analysis. *Pharmacol Res*, 2005; 52: 302-6.
7. **Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol*, 2020; 180: 114147.
8. **Blackburn R, Prashad D.** The avian renal portal system: a model for studying nephrotoxicity of xenobiotics. *Toxicol Letters*, 1990; 53: 219-221.
9. **Boakye MK, Wiafe ED, Ziekah MY.** Ethnomedicinal use of vultures by traditional medicinal practitioners in Ghana. *J African Ornithol*, 2019; 90: 111-118
10. **Bonnefille B, Gomez E, Courant F, Escande A, Fenet H.** Diclofenac in the marine environment: A review of its occurrence and effects. *Mar Pollut Bull*, 2018; 131(Pt A): 496-506.
11. **Braun EJ.** Osmoregulatory system of birds. En: Scanes CG (ed.) *Sturkie's Avian Physiology Sexta edición*, Elsevier Academic Press, 2015, pp. 285-299.
12. **Brenner GM, Stevens CW.** Fármacos para el dolor, la inflamación y los trastornos artríticos - Brenner. En: Brenner. *Farmacología básica*, 5ª Edición Elsevier España, S.L.U. Capítulo 30, 2019, pp. 343-356.
13. **Brocca D, Salvatore S.** Report for 2020 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Technical Report European Food Safety Authority. supporting publication 2022: EN-7143. 91.
14. **Butt-Hussain N, Manitius J.** The evolutionary development of the renin angiotensin aldosterone system and its importance for the survival of the human species. *Arterial Hypertens*, 2021; 25: 1-6.
15. **Cavalcanti GN, Carneiro AC, Lima Alencar L, Fagundes Xavier RM, De Francesco Daher E, Bezerra da Silva, G.** Pathophysiological aspects of nephropathy caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Bras Nefrol*, 2019; 41: 124-130.
16. **Chandramohan S, Mathesh K, Mallord JW, Naidoo V, Mahendran K, Kesavan M, Gaur GK, Pawde AM, Prakash N, Ranade S, Saikia D, Sharma AK, Shringarpure R, Green RE, Prakash VM.** Metabolism of aceclofenac to diclofenac in the domestic water buffalo *Bubalus bubalis* confirms it as a threat to Critically Endangered Gyps vultures in South Asia. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2022; 96: 103984.
17. **CIMAVet.** Centro de Información online de Medicamentos Veterinarios de la AEMPS. Acceso 18 de diciembre de 2022. <https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/home.html>
18. **Cuthbert R, Dave R, Sunder S, Kumar S, Prakash S, Ranade SP, Prakash V.** Assessing the ongoing threat from veterinary non-steroidal anti-inflammatory drugs to Critically Endangered Gyps vultures in India. *Oryx*, 2011; 45: 420-426.
19. **Douros A, Bronder E, Klimpel A, Erley C, Garbe E, Kreutz, R.** Drug-induced kidney injury: A large case series from the Berlin Case-Control Surveillance Study. *Clin Nephrol*, 2018; 89: 18-26.
20. **Dzialowski E, Crossley DA.** The Cardiovascular system. En: Scanes CG (ed.) *Sturkie's Avian Physiology*, Sexta edición, Elsevier Academic Press, 2015, pp 193-271.
21. **Eleni C, Neri B, Giannetti L, Grifoni G, Meoli R, Stravino F, Friedrich KG, Scholl F, Di Cerbo P, Battisti A.** Death of captive-bred vultures caused by flunixin poisoning in Italy. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019; 68: 91-93.
22. **EMA** Diclofenac Summary Report. The European Agency for the Evaluation of Medical Products. EMEA/MRL/885/03-FINAL. 2003.
23. **Frazier DL, Michael PJ, Orosz, SE.** Pharmacokinetic Considerations of the Renal System in Birds: Part I. Anatomic and Physiologic Principles of Allometric Scaling *J Avian Med Surg*, 1995; 9: 92-103.
24. **Galligan TH, Green RE, Wolter K, Taggart MA, Duncan N, Mallord JW, Alderson D, Li Y, Naidoo V.** The non-steroidal anti-inflammatory drug nimesulide kills Gyps vultures at concentrations found in the muscle of treated cattle. *Sci Total Environ*, 2022; 807(Pt 2): 150788.
25. **Galligan TH, Bhusal KP, Paude K, Chapagain D, Joshi AB, Chaudhary IP, Chaudhary A, Baral HS, Cuthbert RJ, Green RE.** Partial recovery of Critically Endangered Gyps vulture populations in Nepal. *Bird Conser Int*, 2020; 30: 87-102.
26. **Gan TJ.** Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin*, 2010; 26:1715-31.
27. **Gewin LS.** Sugar or Fat? Renal Tubular Metabolism Reviewed in Health and Disease. *Nutrients*, 2021; 13: 1580
28. **González F, López I, Suárez L, Moraleda V, Rodríguez C.** Levels of blood lead in Griffon vultures from a Wildlife Rehabilitation Center in Spain. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2017; 143: 143-150.
29. **Green RE, Newton I, Shultz S, Cunningham AA, Gilbert M, Pain DJ, Prakash V.** Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent. *J Appl Ecol*, 2004; 41: 793-800.
30. **Hassan IZ, Duncan N, Adawaren EO, Naidoo V.** Could the environmental toxicity of diclofenac in vultures be predictable if preclinical testing methodology were applied? *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018; 64: 181-186.
31. **Hawkins MG, Sanchez-Migallon Guzman D, Beaufrère H, Lennox A, Carpenter JW.** Nonsteroidal Antiinflammatory Agents Used in Birds. In: *Exotic Animal Formulary*, 5th ed.; Carpenter, J.W., Ed.; Elsevier Saunders: St. Louis, MO, USA, 2018, pp. 236-239.
32. **Herrero-Villar M, Velarde R, Camarero PR, Taggart MA, Bandedira V, Fonseca C, Marco I, Mateo R.** NSAIDs detected in Iberian avian scavengers and carrion after diclofenac registration for veterinary use in Spain. *Environ Pollut*, 2020; 266(Pt 2): 115157.
33. **Herrero-Villar M, Suárez-Regalado L, Solano-Manrique C, Juan-Sallés C, Iglesias-Lebrija JJ, Camarero PR, González F, Álvarez E, Mateo R.** First diclofenac intoxication in a wild avian scavenger in Europe. *Sci Total Environ*, 2021; 782: 146890.
34. **Hussain I, Khan MZ, Khan A, Javed I, Saleemi MK.** Toxicological effects of diclofenac in four avian species. *Avian Pathol*, 2008; 37: 315-21.
35. **IUCN** <https://www.iucnredlist.org/search?query=vulture&searchType=species> Acceso 25 abril 2022.
36. **Locke S, Naidoo V, Hassan I, Duncan N.** Effect of cytochrome P450 inhibition on toxicity of diclofenac in chickens: Unravelling toxicity in Gyps vultures. *Onderstepoort J Vet Res*, 2022; 89: e1-e8.
37. **Matos R, Morrissey JK.** Erythrocytes. In: *Comparative Veterinary Anatomy A Clinical Approach*, 2022, pp 1355-1363.
38. **Meteyer CU, Rideout BA, Gilbert M, Shivaprasad HL, Oaks JL.** Pathology and proposed pathophysiology of diclofenac poisoning in free-living and experimentally exposed oriental white-backed vultures (*Gyps bengalensis*). *J Wildl Dis*, 2005; 41: 707-16.
39. **Moleón M, Sánchez-Zapata JA, Selva N, Donázar JA, Owen-Smith N.** Inter-specific interactions linking predation and scavenging in terrestrial vertebrate assemblages. *Biol Rev Camb*

- Philos Soc, 2014; 89: 1042-54.
40. **Naidoo V, Duncan N, Bekker L, Swan G.** Validating the domestic fowl as a model to investigate the pathophysiology of diclofenac in Gyps vultures. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2007; 24: 260-6.
 41. **Naidoo V, Mompoti KF, Duncan N, Taggart MA.** The Pied Crow (*Corvus albus*) is insensitive to diclofenac at concentrations present in carrion. *J Wildl Dis*, 2011; 47: 936-44.
 42. **Naidoo V, Swan GE.** Diclofenac toxicity in Gyps vulture is associated with decreased uric acid excretion and not renal portal vasoconstriction. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2009a; 149:269-74.
 43. **Naidoo V, Taggart MA, Duncan N, Wolter K, Chipangura, J, Green RE, Galligan TH.** The use of toxicokinetics and exposure studies to show that carprofen in cattle tissue could lead to secondary toxicity and death in wild vultures. *Chemosphere*, 2018; 190: 80-89.
 44. **Naidoo V, Wolter K, Cromarty AD, Bartels P, Bekker L, McGaw L, Taggart MA, Cuthbert R, Swan GE.** The pharmacokinetics of meloxicam in vultures. *J Vet Pharmacol Ther*, 2008; 31: 128-34.
 45. **Naidoo V, Wolter K, Cromarty D, Diekmann M, Duncan N, Meharg AA, Taggart MA, Venter L, Cuthbert R.** Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs to Gyps vultures: a new threat from ketoprofen. *Biol Lett*, 2010; 6: 339-41.
 46. **Naidoo V, Wolter K, Cuthbert R, Duncan N.** Veterinary diclofenac threatens Africa's endangered vulture species. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009b; 3:205-8.
 47. **Nethathe B, Abera A, Naidoo V.** Expression and phylogeny of multidrug resistance protein 2 and 4 in African white backed vulture (*Gyps africanus*). *Peer J*, 2020; 8: e10422.
 48. **Nethathe B, Chipangura J, Hassan IZ, Duncan N, Adawaren EO, Havenga L, Naidoo V.** Diclofenac toxicity in susceptible bird species results from a combination of reduced glomerular filtration and plasma flow with subsequent renal tubular necrosis. *Peer J*, 2021a; 9: e12002.
 49. **Nethathe B, Phaswane R, Abera A, Naidoo V.** Molecular characterization of *Gyps africanus* (African white-backed vulture) organic anion transporter 1 and 2 expressed in the kidney. *PLoS One*, 2021b; 16: e0250408.
 50. **Nethathe B.** 2019. Pathophysiology of diclofenac-associated hiperuricemia in Gyps spp. Vultures. Tesis Doctoral. Universidad de Pretoria. Sudáfrica.
 51. **Ng LE, Halliwell B, Wong KP.** Nephrotoxic cell death by diclofenac and meloxicam. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008; 369: 873-7.
 52. **Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJ, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA.** Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 2004; 427: 630-3.
 53. **Oaks JL, Meteyer CU.** Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Raptors. En: Miller, RE, Fowler, ME. (ed.): *Fowlers Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy*, Volumen 7, Capítulo 46, Saunders, USA, 2012, pp. 349-355.
 54. **Oelofsen BW.** Renal function in the penguin (*Spheniscus demersus*) With special reference to the role of the renal Portal system and renal portal valves. *Zool Afric*, 1971, 8: 41-62.
 55. **Ogada DL, Keesing F, Virani MZ.** Dropping dead: causes and consequences of vulture population declines worldwide. *Ann N Y Acad Sci*, 2012; 1249: 57-71.
 56. **Overveld T, Blanco G, Moleón M, Margalida A, Sánchez-Zapata JA, de la Riva M, Donazar JA.** Integrating vulture social behavior into conservation practice. *Condor*, 2020; 122: 35.
 57. **Potier S.** Visual Adaptations in Predatory and Scavenging Diurnal Raptors. *Diversity*, 2020, 12: 400.
 58. **Rattner BA, Whitehead MA, Gasper G, Meteyer CU, Link WA, Taggart MA, Meharg AA, Pattee OH, Pain DJ.** Apparent tolerance of turkey vultures (*Cathartes aura*) to the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Environ Toxicol Chem*, 2008; 27: 2341-5.
 59. **Rinde M.** 2019. Poison Pill: The Mysterious Die-Off of India's Vultures Acceso el 20 de julio de 2022. <https://www.sciencehistory.org/distillations/poison-pill-the-mysterious-die-off-of-indias-vultures>
 60. **Rodríguez C, Waxman S, de Lucas JJ.** Particularidades anatómicas, fisiológicas y etológicas con repercusión terapéutica, en medicina aviar (I): órganos de los sentidos, aparato respiratorio y urinario. *Pan Act Med*, 2017; 41: 121-131.
 61. **Sanz Mínguez C, Rodríguez Gutiérrez E.** Entierros en el cielo. *Vaccea*, 2013; 6: 74-80.
 62. **SEO/BirdLife.** Libro Rojo de las aves de España. Ed López Jiménez, N Sociedad Española de Orinología 2021.
 63. **Settle T, Carro M, Klandorf H.** The role of uric acid in the avian species. *Uric Acid: Biol Funct Dis*, 2012; 1-30.
 64. **Sharma AK, Saini M, Singh SD, Prakash V, Das A, Dasan RB, Pandey S, Bohara D, Galligan TH, Green RE.** Diclofenac is toxic to the Steppe Eagle *Aquila nipalensis*: widening the diversity of raptors threatened by NSAID misuse in South Asia. *Bird Conserv Int*, 2014; 24: 282286.
 65. **Swan GE, Cuthbert R, Quevedo M, Green RE, Pain DJ, Bartels P, Cunningham AA, Duncan N, Meharg AA, Oaks JL, Parry-Jones J, Shultz S, Taggart MA, Verdoorn G, Wolter K.** Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biol Lett*, 2006; 2: 279-82.
 66. **Taggart MA, Senacha K, Green RE, Cuthbert R, Jhala Y, Meharg AA, Mateo R, Pain DJ.** Analysis of nine NSAIDs in ungulate tissues available to Critically Endangered vultures in India. *Environ Sci Tech*, 2009; 43:4561-4566.
 67. **Vicente J, VerCauteren K.** The Role of Scavenging in Disease Dynamics En: *Carrion Ecology and Management*, Wildlife Research Springer Nature P. P. Olea *et al.* (eds.), Switzerland Monographs 2, 2019, pp 161-178.
 68. **Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR.** Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96: 7563-8.
 69. **Zorrilla I, Martinez R, Taggart MA, Richards N.** Suspected flunixin poisoning of a wild Eurasian Griffon Vulture from Spain. *Conserv Biol*, 2015; 29: 587-92.