

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULDADE DE CIENCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**MODELADO EXPERIMENTAL DE TOXICIDAD
RESPIRATORIA POR FUEL TIPO "PRESTIGE"**

*Modelado experimental de toxicidade respiratoria
por fuel tipo "Prestige"*

TESIS DOCTORAL
Marta Villarnovo Cerrillo

A Coruña, 10 de setembro de 2015



El Dr. ISAAC MANUEL FUENTES BOQUETE, profesor titular del *Departamento de Medicina, Facultade de Ciencias da Saúde* de la *Universidade da Coruña*,

CERTIFICA

Que en calidad de tutor del presente trabajo original de investigación titulado **MODELADO EXPERIMENTAL DE TOXICIDAD RESPIRATORIA POR FUEL TIPO "PRESTIGE"** (*Modelado experimental de toxicidade respiratoria por fuel tipo "Prestige"*) realizado por Marta Villarnovo Cerrillo, autoriza que dicho trabajo sea presentado como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente en la *Universidade da Coruña*.

En A Coruña, a 10 de septiembre de 2015

Dr. Isaac Manuel Fuentes Boquete



El Dr. DAVID RAMOS BARBÓN, coordinador de la *Unitat de Pneumologia Experimental* del *Departament de Pneumologia e Institut de Recerca Biomèdica* del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*, Barcelona, y profesor asociado del *Department of Medicine* de *McGill University*, Montreal,

CERTIFICA

Que el presente trabajo original de investigación titulado **MODELADO EXPERIMENTAL DE TOXICIDAD RESPIRATORIA POR FUEL TIPO "PRESTIGE"** (*Modelado experimental de toxicidade respiratoria por fuel tipo "Prestige"*) ha sido realizado bajo su dirección por Marta Villarnovo Cerrillo en la *Unidade de Investigación Respiratoria* del *Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña* (INIBIC) del *Complexo Hospitalario Universitario A Coruña* y en el *Institut de Recerca Biomèdica* del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau* en Barcelona, estimando que este trabajo se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente en la *Universidade da Coruña*.

En Barcelona, a 10 de septiembre de 2015

Dr. David Ramos Barbón

RESUMO

A exposición inhalada a compostos volátiles orgánicos (*volatile organic compounds*, VOCs) asociouse historicamente, de forma repetida, a catástrofes de verquidos marítimos de buques petroleiros ou plataformas petrolíferas. Tras a catástrofe do afundimento do petroleiro Prestige fronte ás costas de Galicia en 2002, os suxeitos involucrados nas tarefas de limpeza de costas mostraron síntomas respiratorios e tendencia á hiperreactividade bronquial que persistiron ata 5 anos tras a exposición. Estas anormalidades semiolóxicas e funcionais poden estar causadas por lesións descoñecidas no aparato respiratorio. No presente estudo, o noso obxectivo foi afondar no coñecemento das consecuencias da inhalación de VOCs "tipo Prestige" sobre a fisiopatoloxía respiratoria. Para esta finalidade desenvolvemos un modelo experimental, co apoio de expertos en refinaría petrolífera, enxeñaría de equipamento respiratorio experimental para animais de laboratorio, toxicoloxía, e análise de VOCs. Neste modelo, expuxéronse á inhalación de VOCs "tipo Prestige" a grupos de ratas de cepa *Wistar* e *Brown Norway*, e ratos de cepa C57BL, fronte a animais control non expostos. Os animais foron expostos 2 horas diarias, 5 días á semana, durante un período de tres semanas e, seguidamente, realizáronse dous puntos de corte de obtención de datos: inmediatamente tras a finalización do período de exposición e tras un período de lavado de 2 semanas libre de exposición, respectivamente. A finalidade do corte de datos tardío (tras o período de lavado) foi permitir un período de restablecemento que simulase o punto de recollida de datos clínicos no principal estudo epidemiolóxico realizado tras a catástrofe do Prestige, 2 anos tras a exposición. A inhalación de VOCs induciu en ambas as dúas cepas de rata (non na de rato) o desenvolvemento de hiperreactividade de vías respiratorias no momento inmediato á finalización da exposición, a cal persistiu

na medición tardía tras o período de lavado. Non se achou ningunha evidencia de resposta inmunitaria inflamatoria mediante o exame histopatolóxico de seccións pulmonares, o recuento leucocitario en lavado broncoalveolar, ou a medición de concentración de citoquinas neste. Non obstante, as ratas expostas desenvolveron un patrón atípico de enfisema pulmonar periférica, de localización subpleural. A análise *in situ* mediante a técnica de *terminal transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) revelou a presenza de apoptose en neumocitos do parénquima pulmonar, como explicación plausible da devandita enfisema. En ausencia de inflamación e remodelación de vías respiratorias, a referida enfisema pulmonar periférica pode explicar a presenza de hiperreactividade bronquial mediante a disociación da interdependencia mecánica entre vías respiratorias e parénquima pulmonar. Estes resultados poden contribuír un mellor coñecemento sobre os efectos da inhalación de VOCs sobre o aparato respiratorio, aínda que non existen datos que permitan corroborar se os fenómenos detectados neste modelo se produciron nas persoas con exposición inhalada a VOCs da vertedura do buque *Prestige* e/ou catástrofes similares.

RESUMEN

La exposición inhalada a compuestos volátiles orgánicos (*volatile organic compounds*, VOCs) se ha asociado históricamente, de forma repetida, a catástrofes de vertidos marítimos de buques petroleros o plataformas petrolíferas. Tras la catástrofe del hundimiento del petrolero Prestige frente a las costas de Galicia en 2002, los sujetos involucrados en las tareas de limpieza de costas mostraron síntomas respiratorios y tendencia a la hiperreactividad bronquial que persistieron hasta 5 años tras la exposición. Estas anomalías semiológicas y funcionales pueden estar causadas por lesiones desconocidas en el aparato respiratorio. En el presente estudio, nuestro objetivo ha sido profundizar en el conocimiento de las consecuencias de la inhalación de VOCs "tipo Prestige" sobre la fisiopatología respiratoria. Para esta finalidad desarrollamos un modelo experimental, con el apoyo de expertos en refinería petrolífera, ingeniería de equipamiento respiratorio experimental para animales de laboratorio, toxicología, y análisis de VOCs. En este modelo, se expusieron a la inhalación de VOCs "tipo Prestige" a grupos de ratas de cepa Wistar y Brown Norway, y ratones de cepa C57BL, frente a animales control no expuestos. Los animales fueron expuestos 2 horas diarias, 5 días a la semana, durante un periodo de tres semanas y, seguidamente, se realizaron dos puntos de corte de obtención de datos: inmediatamente tras la finalización del periodo de exposición y tras un periodo de lavado de 2 semanas libre de exposición, respectivamente. La finalidad del corte de datos tardío (tras el periodo de lavado) fue permitir un periodo de restablecimiento que simulase el punto de recogida de datos clínicos en el principal estudio epidemiológico realizado tras la catástrofe del Prestige, 2 años tras la exposición. La inhalación de VOCs indujo en ambas cepas de rata (no en la de ratón) el desarrollo de hiperreactividad de vías respiratorias en el momento

inmediato a la finalización de la exposición, la cual persistió en la medición tardía tras el periodo de lavado. No se halló ninguna evidencia de respuesta inmunitaria inflamatoria mediante el examen histopatológico de secciones pulmonares, el recuento leucocitario en lavado broncoalveolar, o la medición de concentración de citoquinas en el mismo. Sin embargo, las ratas expuestas desarrollaron un patrón atípico de enfisema pulmonar periférico, de localización subpleural. El análisis *in situ* mediante la técnica de *terminal transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) reveló la presencia de apoptosis en neumocitos del parénquima pulmonar, como explicación plausible de dicho enfisema. En ausencia de inflamación y remodelación de vías respiratorias, el referido enfisema pulmonar periférico puede explicar la presencia de hiperreactividad bronquial mediante la disociación de la interdependencia mecánica entre vías respiratorias y parénquima pulmonar. Estos resultados pueden contribuir un mejor conocimiento sobre los efectos de la inhalación de VOCs sobre el aparato respiratorio, aunque no existen datos que permitan corroborar si los fenómenos detectados en este modelo se han producido en las personas con exposición inhalada a VOCs del vertido del buque *Prestige* y/o catástrofes similares.

SUMMARY

Inhaled exposure to oil-derived volatile compounds is associated with marine oil spills. After the Prestige oil tanker sank off northern Spain in 2002, subjects involved in coast cleaning showed ongoing or residual lung disease up five years after the exposure. Unknown pulmonary lesions may underlie these functional abnormalities. We aimed to uncover the exact lung pathology caused by oil vapour inhalation by developing an animal model of inhaled exposure to oil-derived volatile compounds. Wistar and Brown Norway rats and C57BL mice were exposed to volatile compounds produced from an oil blend mimicking the Prestige oil spill. Exposed animals inhaled oil vapours for 2 hours per day, 5 days per week, for 3 weeks. Airway response to methacholine was assessed, and bronchoalveolar lavage and lung tissue were analysed on day 3 after exposition and after a 2-week washout period. The inhalation of oil-derived volatile compounds caused the rats to develop bronchial hyperresponsiveness that persisted after the washout period. Although lung analysis did not show cellular inflammatory infiltrates, oil vapour exposure induced paraseptal-like pulmonary emphysema in all exposed rats. Pulmonary emphysema was associated with an increase in the rate of pneumocyte apoptosis in the lung parenchyma, even after the washout period. Our results indicate that the inhalation of oil-derived volatile compounds caused DNA damage and increased the rate of apoptosis in pneumocytes. The destruction of lung parenchyma led to paraseptal-like emphysema underlying hyperresponsiveness to methacholine. This finding contributes to a better understanding of late lung effects of inhaled exposure to oil spills.

FINANCIACIÓN

El proyecto presentado en esta tesis doctoral fue primariamente financiado por los *Programas Sectoriais de Investigación Aplicada del Plan Galego de Investigación, Desenvolvemento e Innovación Tecnolóxica (Incite), Consellería de Innovación e Industria, Xunta de Galicia*, con expediente de concesión 07CSA048916PR. Equipo inventariable preexistente o adicional utilizado y recursos humanos participantes en tareas de la ejecución del proyecto, correspondiente todo ello a la infraestructura de la *Unidade de Investigación Respiratoria del Complexo Hospitalario Universitario A Coruña/Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)* fueron cofinanciados por el programa de *Consolidación e Estruturación de Unidades de Investigación (Plan Incite, Xunta de Galicia*, expediente de concesión INCITE07PXI916208ES), el Instituto de Salud Carlos III (proyecto FIS PI08/1822 y becas FI07/00399 y FI05/00171) y la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR, beca 05/107). El Instituto Tecnológico de Galicia (ITG) declaró a estas investigaciones proyecto de interés especial y actuó como ente promotor-observador (EPO).

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo, quiero agradecer al director de mi tesis, el Dr. David Ramos Barbón y a Nadia Brienza, el creer en mí desde el primer momento, en compartir conmigo todo su conocimiento, experiencia y su tiempo dedicado durante todo este largo camino, en el que ha habido momentos duros pero también muy gratificantes, y por hacer que lo que parecía imposible fuese posible, gracias a su gran capacidad de trabajo, dedicación, lucha y esfuerzo. Todo un ejemplo a seguir, lo cual es un orgullo para mí el haber podido vivir juntos esta experiencia. También deseo agradecer a mi tutor académico el Prof. Isaac Manuel Fuentes Boquete, toda su ayuda y apoyo que nos ha brindado desde el primer momento y por motivarnos, guiarnos y animarnos a que condujésemos a término esta tesis doctoral.

Agradecer a mis padres, Jose y Begoña, todo lo que soy, sin su apoyo incondicional en todo momento, esto no hubiese sido posible, por la educación que me han dado, por enseñarme los valores fundamentales de la vida, por estar siempre a mi lado y no dejar que me hundiera en los momentos más complicados, por tenerlos como guía y ejemplo a seguir, por su forma de ser única y admirable, su capacidad de lucha y sacrificio y por no perder nunca la alegría de vivir. Por todo esto, por ser los mejores y mucho más, gracias de corazón.

Agradecer a mi marido, Alejandro, el estar siempre a mi lado, por apoyarme en todo lo que hago, por hacer que nunca pierda la sonrisa en este camino que hemos decidido recorrer juntos y por luchar día a día para que los sueños se hagan realidad. Sin su apoyo y la confianza depositada en mí, esta tesis no hubiese visto la luz.

Agradecer a mis padrinos, Alberto y Marta, el estar siempre cerca, en creer y confiar en mí y en animarme a luchar hasta el final.

Agradecer a mis abuelos, todo lo que han hecho por nosotros. Siempre presentes.

Agradecer a mis amigos, el estar siempre a mi lado, el vivir y compartir juntos tantos momentos, el hacer que todo sea más fácil y de los que siempre he recibido una palabra de ánimo. Los amigos son la familia que cada uno elige y estoy totalmente convencida de que una de las cosas de las que puedo presumir en la vida es de los grandes amigos que tengo, lo que me hace sentir afortunada. No voy a nombrar a todos ya que ellos saben quiénes son y lo importantes que son en mi vida, sólo hacer una mención a mí amigo, Diego, por haber creído siempre en mí, por su apoyo y por estar siempre cerca.

Por último y de forma muy importante, mi profundo agradecimiento hacia todas las personas y entes que en diversas formas y desde distintos lugares han estado involucrados desde el principio hasta el final de esta tesis con los complejos retos que el proyecto bajo ella ha conllevado, desde las entidades colaboradoras y asesoras como *Electro-Medical Measurement Systems*, la *British Toxicology Society*, Repsol S.A., el Instituto Tecnológico de Galicia y los *Servizos de Asistencia á Investigación* de la *Universidade da Coruña*, hasta las varias agencias financiadoras y las instituciones de acogida: el *Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC & Complexo Hospitalario Universitario A Coruña)* y el *Institut de Recerca Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*, Barcelona. En este apartado incluyo de forma muy especial a Óscar Amor Carro, Kathryn M. White, Rebeca Fraga Iriso y Beatriz Lema Costa, como parte de los integrantes del equipo de investigación en ciencia básica del Dr. David Ramos Barbón que han estado directa y profundamente implicados en las laboriosísimas tareas de grupo multidisciplinar que la ejecución de este proyecto de investigación ha conllevado. Sin el trabajo y entrega de todos, este proyecto no se hubiese podido realizar.

ABREVIATURAS

AFNOR: Association Française de Normalisation	MARPOL: MARine POLLution (International Convention for the Prevention of Pollution from Ships)
ANOVA: Análisis de la varianza	MDCP: Marine Disaster Prevention Center
API: American Petroleum Institute	MSA: Maritime Safety Administration
ARRIVE: Animal Research: Reporting In Vivo Experiments	NOAA: National Oceanic and Atmospheric Administration
ASTM: American Society for Testing and Materials	NTSB: National Transportation Safety Board
BAL: Bronchoalveolar Lavage	N _v : densidad numérica (cantidad numérica en volumen)
BN: Brown Norway	PAS: Periodic acid–Schiff
BTEX: Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos	PBS: Phosphate-Buffered Saline
BTS: British Toxicology Society	R _L : Lung Resistance
EMMS: Electro-Medical Measurement Systems	ROV: Remotely Operated underwater Vehicle
EPA: Escuadrón de Protección Ambiental (USA)	SAI: Servicios de Asistencia á Investigación
FGF: Fibroblast Growth Factor	SEM: Standard Error of the Mean
FOT: Forced Oscillation Technique	SGE: Specialty Gas Equipment
HEPA: High-Efficiency Particulate Arrestance	TAC: Tomografía Axial Computarizada
<i>i.v.</i> : intravenoso/a	TBP: True Boiling Point
IFN: Interferon	Th: T helper
IL: interleuquina	TNF: Tumor Necrosis Factor
IMO: International Maritime Organization	TUNEL: Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling
INIBIC: Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña	VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
L _m : Mean Linear Intercept	VOCs: Volatile Organic Compounds
LSD: Least Significant Difference	V _v : "Volume in Volume", densidad volumétrica

ÍNDICE

Autorización tutor académico.....	i
Autorización director de tesis.....	iii
RESUMO	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	ix
FINANCIACIÓN	xi
AGRADECIMIENTOS	xiii
ABREVIATURAS	xv
INTRODUCCIÓN	5
1. Industria del petróleo y tráfico marítimo de hidrocarburos.....	7
1.1 Tráfico marítimo de hidrocarburos.....	11
2. Historial de catástrofes en el transporte de hidrocarburos.....	13
2.1. Exxon Valdez (Alaska, 24 de marzo de 1989).....	14
2.2. Braer (Escocia, 5 de enero de 1993).....	16
2.3. Sea Empress (Gales, 15 de Febrero de 1996).....	18
2.4. Nadkodka (Japón, 2 de Enero de 1997).....	21
2.5. Erika (Francia, 12 de diciembre de 1999).....	25
3. Historia específica de la catástrofe “Prestige”.....	27
3.1. El Barco: el petrolero Prestige.....	28
3.2. La carga del Prestige.....	29
3.3. Las causas del accidente del Prestige.....	30
3.4. Cronología del hundimiento de Prestige.....	31
3.5. Las consecuencias de la marea negra.....	33
3.6. Actuaciones frente a los daños ocasionados por la marea negra.....	36
3.7. Consecuencias económicas y sociales de la catástrofe del Prestige.....	37
4. Consecuencias generales de la exposición accidental a hidrocarburos.....	38
5. Efectos de la inhalación de hidrocarburos.....	41
6. Sumario y planteamiento general del estudio.....	44

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
MÉTODOS	53
1. Aspectos normativos.....	55
2. Animales.....	55
3. Diseño del estudio.....	56
4. Fiel de exposición y especificaciones técnicas.....	57
5. Sistema de exposición.....	59
6. Verificación de composición de VOCs en el aire inhalado.....	62
7. Mediciones in vivo de hiperreactividad de vías respiratorias.....	64
8. Recolección y procesamiento de muestras biológicas.....	66
8.1. Lavado broncoalveolar (BAL).....	66
8.2. Disección y procesamiento pulmonar.....	67
9. Morfología cuantitativa del parénquima pulmonar.....	68
9.1. Extracción digital de paredes alveolares.....	69
9.2. Método de Mean Linear Intercept (L_m).....	69
10. Detección y morfología cuantitativa de células apoptóticas.....	71
11. Análisis de datos.....	71
RESULTADOS	73
1. Hiperreactividad de vías respiratorias.....	75
2. Inflamación y remodelación de vías respiratorias.....	78
3. Enfisema pulmonar.....	84
4. Apoptosis de neumocitos.....	89
DISCUSIÓN	93
Resumen y consideraciones finales.....	104
CONCLUSIONES	109
REFERENCIAS	113
Anexo 1 - Protocolo técnica de TUNEL	

Lista de Figuras

Fig. 1. Mapa de las principales reservas de petróleo en el mundo.....	10
Fig. 2. Movimiento de Petróleo a través de puntos estratégicos.....	12
Fig. 3. Mapa de la zona afectada por el vertido del Exxon Valdez.....	15
Fig. 4. Mapa hundimiento Sea Empress y zona afectada.....	19
Fig. 5. Mapa hundimiento Nakhodka y zona afectada.....	23
Fig. 6. Mapa hundimiento Erika y zona afectada.....	25
Fig. 7. Secciones longitudinal y transversal del buque Prestige.....	28
Fig. 8. Ruta del hundimiento del Prestige.....	33
Fig. 9. Mapa del litoral afectado por el vertido del Prestige.....	35
Fig. 10. Diseño del estudio.....	56
Fig. 11. Diagrama del equipo de exposición a VOCs.....	60
Fig. 12. Equipo de exposición a VOCs.....	61
Fig. 13. Gradilla para cálculo de índice L_m	70
Fig. 14. Reactividad de vías respiratorias.....	76
Fig. 15. Recuentos leucocitarios totales en BAL.....	79
Fig. 16. Secciones pulmonares, tinción hematoxilina-eosina.....	81
Fig. 17. Análisis de citoquinas en sobrenadante de BAL.....	82
Fig. 18. Tinciones PAS y tricómico de Masson.....	83
Fig. 19. Evaluación de enfisema pulmonar.....	85
Fig. 20. Detección de células apoptóticas en parénquima pulmonar.....	90
Fig. 21. Localización histopatológica de neumocitos TUNEL ⁺	91

Lista de Tablas

Tabla 1. Tipos de petróleo según sus características físicas.....	8
Tabla 2. Composición y toxicidad del fuel Prestige.....	30
Tabla 3. Especificaciones técnicas fuel Repsol S.A.	58
Tabla 4. Verificación analítica de VOCs en los puertos de exposición.....	63
Tabla 5. Escala de concentraciones de metacolina.....	66
Tabla 6. Datos de reactividad de vías respiratorias (R_L).....	77
Tabla 7. Recuentos celulares totales en BAL.....	80
Tabla 8. Cuantificación de enfisema pulmonar (densidad volumétrica).....	87
Tabla 9. Cuantificación de enfisema pulmonar (<i>mean linear intercept</i>).....	88
Tabla 10. Densidad numérica de neumocitos TUNEL ⁺	92

INTRODUCCIÓN

1. Industria del petróleo y tráfico marítimo de hidrocarburos

La palabra petróleo proviene del término latín *petroleum*, donde *petra* significa roca o piedra y *óleum* significa aceite, siendo su significado etimológico aceite de piedra.¹ Así bautizaron los romanos al líquido negro que salía del fondo de la tierra, del que creían que provenía de las rocas más profundas.

Científicamente se define petróleo como un conjunto de compuestos químicos complejos cuya composición principal es hidrógeno (hidro) y carbono (carburo) y de ahí que los distintos tipos de petróleo se llaman hidrocarburos. Un petróleo se diferencia de otro por su color, su olor, su densidad y hasta por su sabor. Estas diferencias provocadas por variaciones en su composición química dan lugar a los diferentes tipos de crudo. Los compuestos químicos se diferencian por sus propiedades volátiles, por lo que al calentar el petróleo los compuestos de bajo peso molecular y estructura sencilla, los ligeros, se evaporan y al aumentar la temperatura se evaporan los componentes más pesados con un elevado peso molecular. Con las curvas de destilación TBP (*True Boiling Point*) se puede diferenciar los tipos de petróleo. La industria de hidrocarburos clasifica los tipos de petróleo en extrapesado, pesado, mediano, ligero y extraligero basándose en su densidad y su grado *API gravity* (*American Petroleum Institute gravity*), parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo, que diferencia las calidades del crudo.² En la Tabla 1 se muestran los tipos según sus características físicas.

Tabla 1: Tipos de petróleo según sus características físicas.²

Tipo de Petróleo	Densidad (g/mL)	Grado API
Extrapesado	>1.0	<10
Pesado	0.92 a 1.0	<22
Mediano	0.87 a 0.92	<31
Ligero	0.83 a 0.87	<30
Superligero	<0.83	>39

En su inicio, el petróleo fue utilizado como combustible para el fuego y para la guerra; su gran importancia en la economía mundial se desarrolló de manera muy lenta, siendo las principales fuentes de energía del momento la madera y el carbón. La industria petrolera apareció en el siglo VIII cuando las calles de Bagdad fueron pavimentadas con alquitrán (*tar*) derivado del petróleo por medio de destilación destructiva.³ En el siglo IX se llegaron a explotar campos petroleros en el área cercana a Bakú, en Azerbaiyán, para producir nafta. Estos campos fueron descritos por al-Masudi en el siglo X, y por Marco Polo en el XIII, que calificó a la producción de esos pozos petrolíferos como de cientos de naves.³ Ya entrando en siglo XIX, fue cuando el petróleo comenzó a tener una fuerte demanda, momento en el cual, con el desarrollo de la revolución industrial surge cada vez una mayor necesidad de energía, la cual se abastecía hasta el momento principalmente de carbón, unido al descubrimiento de que el queroseno, utilizado en la producción de lámparas de aceite,⁴ podía extraerse del petróleo crudo, y por lo tanto podía utilizarse como combustible. Todos estos avances junto con el fuerte desarrollo industrial en todos los sectores, entre ellos los tecnológicos y automovilísticos, hizo que en el siglo XX

el petróleo se convirtiese en una de las principales materias primas del comercio mundial y consecuentemente la más demandada.⁵

Unos de los principales impulsores-productores de crudo fue la Rusia Imperial, con una producción de más de 7000 toneladas a mediados del siglo XIX.⁶ A la llegada del siglo XX, la producción de crudo del Imperio ruso, que procedía casi íntegramente de la península Abseron, representaba la mitad de la producción mundial y dominaba los mercados internacionales.⁷ Por otro lado, y como efecto secundario de este temprano desarrollo de la industria petrolera, la península de Abseron emergió como uno de los casos más antiguos y graves a nivel mundial de negligencia medioambiental.⁸ Ignacy Lukaszewicz, fue el precursor de las primeras refinerías petroleras modernas en Europa central (Polonia), entre los años 1854 y 1856.⁹ Estas tenían un tamaño reducido pues la demanda de combustible refinado era todavía pequeña. Trataban el petróleo para la fabricación de asfalto artificial, aceite para maquinaria y lubricantes, además de para combustible de lámparas de queroseno de Lukaszewicz.⁹ A medida que las lámparas de queroseno ganaban popularidad, la industria de refino creció en el área. En Rumania, en el año 1856, fue inaugurada la primera refinería de gran tamaño. En 1878, Ludvig Nobel y su compañía Branobel revolucionaron el transporte de crudo con la fabricación y puesta en funcionamiento del primer petrolero en el mar Caspio.⁷

En 1859, en Estados Unidos se inició la primera perforación exitosa en Titusville, Pensilvania. En el primer cuarto del siglo XX, Estados Unidos superó a Rusia como productor de petróleo más grande del mundo. En 1863, en Zorritos, Perú, se desarrolló el segundo polo de producción petrolera americana más importante hasta la década de los años treinta. Aunque ya en la década de los años veinte, se habían puesto en funcionamiento campos

petrolíferos en muchos países del mundo, como fue en Canadá, Polonia, Suecia, Ucrania, Estados Unidos y Venezuela. En 1947, la primera plataforma petrolera marítima en el Golfo de México fue construida por Superior Oil.¹⁰ En el siguiente mapa (Fig.1) se muestran las principales reservas de petróleo en el mundo.¹¹

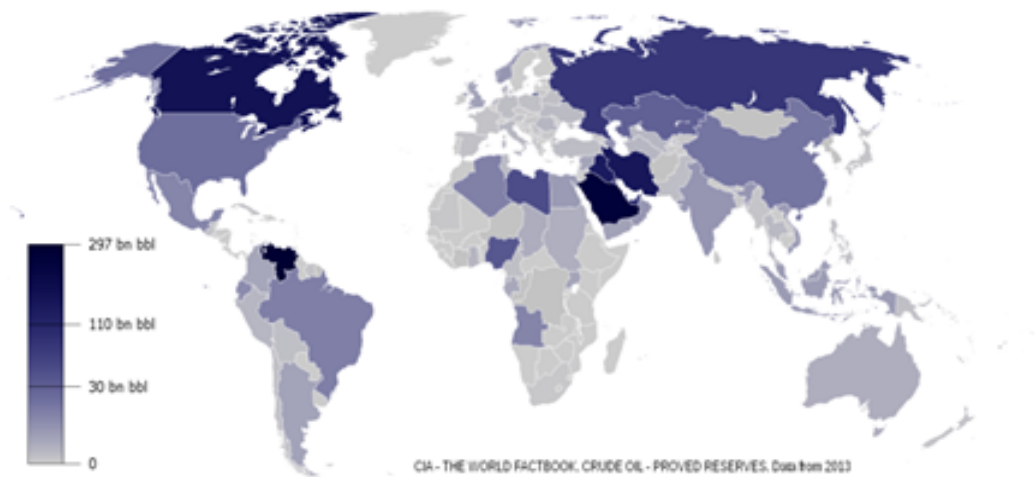


Figura 1. Mapa de las principales reservas de petróleo en el mundo.¹¹

Durante la década de los años 60, compañías multinacionales tales como Mobil, BP y Shell tuvieron acceso a más del 80 por ciento de las reservas globales de gas natural y petróleo. En la actualidad, compañías multinacionales de occidente controlan solamente el 10% del petróleo del mundo, mientras que firmas operadas por gobiernos tienen el control exclusivo de aproximadamente el 77%.¹²

1.1 Tráfico marítimo de hidrocarburos

El petróleo es el producto de base más transportado en el mundo. La Unión Europea ocupa el primer lugar en el comercio de productos petrolíferos a nivel mundial. Sus importaciones de petróleo crudo representan aproximadamente el 27% del comercio mundial total, mientras que las importaciones de Estados Unidos ascienden a un 25 %.¹³ Alrededor del 90% del comercio de petróleo con la Unión Europea se efectúa por mar, realizándose el resto del transporte por oleoductos, por carretera o por vías navegables, y se prevé un aumento continuo del comercio de petroleros en los próximos años debido a la mayor demanda de productos petrolíferos.¹³

Anualmente se transportan 800 millones de toneladas de petróleo desde los puertos comunitarios de la Unión Europea o con destino a ellos. Aproximadamente el 70% del transporte marítimo de petróleo en la Unión Europea se efectúa frente a las costas del Atlántico y del Mar del Norte, efectuándose el 30% restante por el Mar Mediterráneo,¹³ haciendo que estas zonas sean las más vulnerables a accidentes marítimos con buques que transportan hidrocarburos y a las denominadas “mareas negras”, tal y como ponen de manifiesto los distintos naufragios ocurridos en las últimas décadas. A esto se le debe añadir el hecho de que numerosos petroleros navegan en aguas comunitarias sin realizar escala alguna, lo cual supone portar un mayor volumen, y consecuentemente generan un peligro suplementario.

Los principales puertos petroleros de la Unión Europea son Rotterdam, Marsella, Le Havre, Trieste y Wilhelmshaven. El petróleo importado procede principalmente de Oriente Medio y África del Norte, mientras que las exportaciones europeas, desde explotaciones petrolíferas del Mar del Norte, se dirigen sobre todo a Norteamérica.¹³ En el siguiente mapa (Fig. 2) se pueden observar las principales rutas marítimas de transporte de hidrocarburos.¹⁴

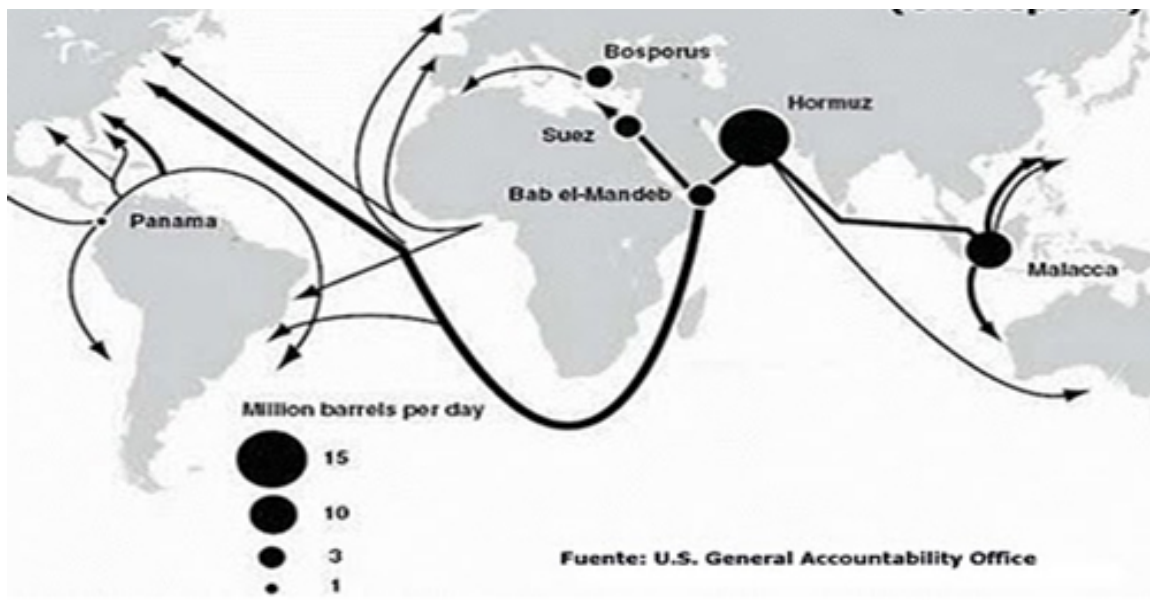


Figura 2. Movimiento de Petróleo a través de puntos estratégicos.¹⁴

Todos los años navegan en aguas comunitarias de la Unión Europea de 1.500 a 2.000 petroleros. Los grandes petroleros, de más de 200.000 toneladas, dominan el mercado del transporte de petróleo crudo. No obstante, en el Mar del Norte se utilizan buques más pequeños, con un arqueo de 5.000 a 50.000 toneladas.¹³

En 1999, la edad media de la flota mundial de petroleros era de 18 años y el 41% de los buques tenía más de 20 años. El arqueo de estos últimos representan el 36% del arqueo total de los petroleros. En la Unión Europea en el año 1999, la edad media de los petroleros registrados era de 19,1 años. Más del 45% de la flota europea tiene más de 20 años. No obstante, las empresas europeas recurren con frecuencia a los pabellones extranjeros para registrar

sus buques; por ello, los buques europeos enarbolan a menudo los pabellones de Liberia, Panamá, Chipre, Malta o las Bahamas.¹³

A escala mundial, entre 1992 y 1999 naufragaron un total de 593 buques, de los cuales 77 eran petroleros, es decir, un 13% del número total, que equivale al 31% del arqueo total.¹³ Hoy en día el transporte marítimo de crudo mueve unos 1.800 millones de toneladas por todo el mundo y la mayoría de las veces de forma segura. Las medidas introducidas por la *International Maritime Organization* (IMO) ayudan a que así sea. Con la construcción de buques más seguros, las pérdidas de crudo por maniobras rutinarias en puerto han sido prácticamente eliminadas.¹⁵ Ante estas cifras, puede decirse que los resultados en términos de seguridad no son buenos, ya que a pesar de que el número de catástrofes marítimas no es elevado, su magnitud y sus impactos marítimos y costeros han sido devastadores.

2. Historial de catástrofes en el transporte de hidrocarburos

A lo largo de la historia han sucedido diversas catástrofes de derrames petrolíferos, las denominadas “mareas negras”, ocasionadas a raíz de hundimientos de petroleros frente a las costas de diferentes países, afectando gravemente a los ecosistemas y consecuentemente dañando la flora, la fauna y la pesca de las zonas afectadas, así como las actividades económicas relacionadas directa e indirectamente.

La primera marea negra provocada por un petrolero y documentada fue en 1893, cuando el primer petrolero de la historia encalla en medio de una espesa niebla en la isla Fire (Nueva York) donde finalmente se hunde tras numerosos intentos de reflotarlo.¹⁵ A esta primera catástrofe le siguen muchas otras; desde la década de los años sesenta en el siglo XX hasta la actualidad se han

registrado unos 100 accidentes marítimos que han provocado vertidos de distintos tipos de crudo o fuel derivado.¹⁵ A continuación se detallan las catástrofes más representativas de las últimas décadas, de accidentes marítimos con buques que transportaban fuel y han provocado vertidos.

2.1. Exxon Valdez (Alaska, 24 de marzo de 1989)

El 24 de marzo de 1989, alrededor de las 00:04 h., el buque petrolero Exxon Valdez golpeó el arrecife de coral conocido como Bligh Reef, situado en Prince William Sound, en Alaska, y derramando cerca de 10,8 millones de galones de petróleo crudo (alrededor de 40,9 millones de litros). El barco tenía aproximadamente 300 metros de eslora y con un desplazamiento de 280,000 toneladas, cargado a su máxima capacidad. En 1989 era el segundo barco más nuevo en la Compañía Marítima de Exxon, el cual sólo era maniobrado por 19 tripulantes más el Capitán. El accidente fue debido principalmente a que dos de los integrantes de la tripulación, el tercer oficial de cubierta, Gregory Cousins, a cargo del puente de mando y el timonel, Robert Kagan, a cargo del timón, no habían descansado las seis horas obligatorias en su trabajo antes de comenzar su turno de 12 horas. El barco navegaba en piloto automático, con el sistema de navegación que había instalado la compañía armadora del barco. La vía de salida del barco estaba cubierta por icebergs, así que el capitán, Hazelwood, solicitó permiso de la guardia costera para salir a través de la vía de entrada. El tercer oficial, al paso de Busby Island, ordenó poner el timón a estribor y no advirtió que todavía estaba conectado el piloto automático, lo que provocó que el barco no girase. Los vigías advirtieron varias veces al tercer oficial de la posición del arrecife, pero éste no interpretó ninguna señal de peligro. Cuando el tercer oficial se percató del error de trayectoria que llevaba el barco desconectó el piloto automático e intentó corregir la dirección del

barco, pero ya era demasiado tarde y el petrolero colisionó con el arrecife.¹⁶ Las cerca de 40 toneladas de petróleo crudo derramadas afectaron a más de 2.000 Km de costa, donde se vio dañada la fauna y miles de aves marinas murieron como consecuencia del derrame, ocasionando también un grave impacto en la industria pesquera de la región. En la siguiente figura (Fig. 3) se refleja la zona afectada por vertido del petrolero.¹⁷

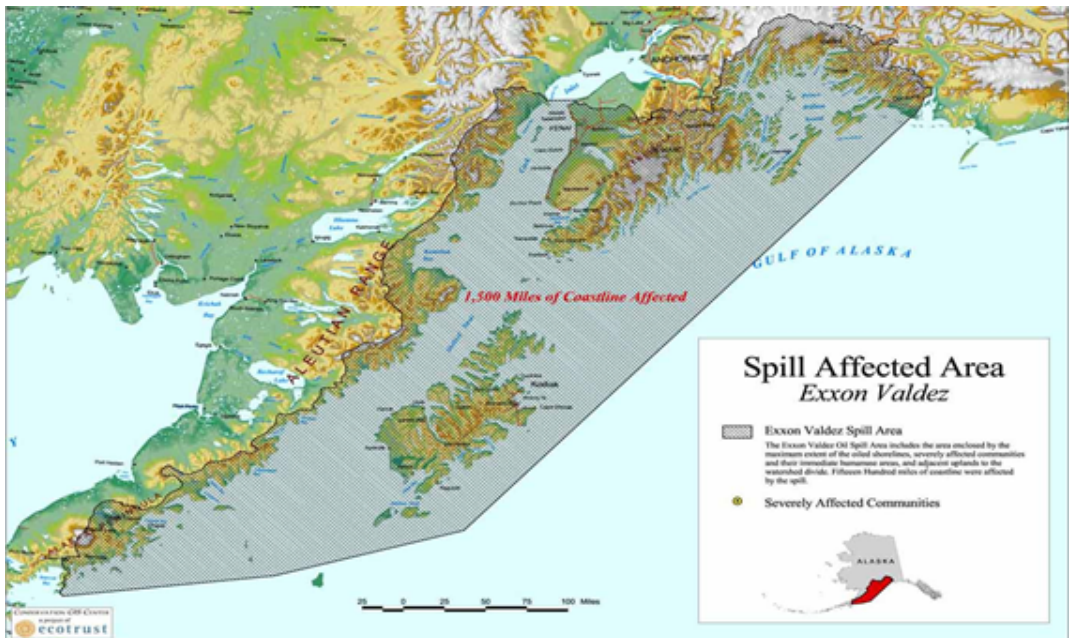


Figura 3. Mapa de la zona afectada por el vertido del Exxon Valdez.¹⁷

El incidente puso a prueba la capacidad de respuesta tanto de las autoridades locales como las nacionales, debido a su compleja ubicación a la cual solo se podía acceder por mar y por aire. En las tareas de limpieza intervinieron Alyeska (Asociación que representa a siete compañías petroleras que funcionan en el puerto de Valdez, entre ellas Exxon), la EPA (Escuadrón de Protección Ambiental de los Estados Unidos), la NOAA (Administración

Nacional Oceánica y Atmosférica), el Instituto de Marina de Hubbs en San Diego y el Centro Internacional de Investigaciones sobre Aves de Berkeley (California). Para llevar a cabo las tareas de limpieza se utilizaron dispersantes químicos (Corexit 9580) producido por Nalcon Holding Company, sistemas mecánicos (bombas extractoras y utillaje para retirar materia flotante sobre líquidos o *skimmers*), la quema, con la cual se logró reducir de 113.400 a 1.134 litros el residuo, y microorganismos llamados *Arqueas*, que tienen la capacidad de metabolizar moléculas de hidrocarburos, desintegrando por completo la mancha y evitando de esta manera una multa billonaria por parte de Canadá a USA.

En 1995 finalizó el juicio civil por el accidente marítimo, en donde se estableció que Exxon Corporation debía de pagar 5.000 millones por daños punitivos. Asimismo la Junta Nacional de Seguridad en el Transporte (NTSB) en su informe final sobre la catástrofe del Exxon Valdez, dictaminó que la falta de sueño había sido la causa directa del accidente.¹⁶

2.2. Braer (Escocia, 5 de enero de 1993)

El 3 de enero de 1993, tras completar la carga de 84.700 toneladas de crudo en el puerto noruego de Mongstad, zarpó rumbo a la refinería canadiense de St. Romuald el buque “Braer”, un petrolero monocasco de 89.730 toneladas que pertenecía a la compañía norteamericana “Braer Corp.”, abanderado de Liberia (conveniencia). En la mañana del 4 de enero de 1993, sufriendo un temporal de fuerza 10 a 11 y con olas de más de 10 metros, unos tubos estibados a popa se desamarraron, en la misma banda por donde batía el temporal. Con los movimientos de balanceo del barco, los tubos golpearon y rompieron las ventilaciones de los tanques de diesel de la sala de máquinas,

entrando a través de ellas agua de mar que comenzó a contaminar el diesel del buque. A las 04:40 horas del 5 de enero, el motor principal se paró y seguidamente lo hicieron los motores auxiliares, dejando al “Braer” sin propulsión y a oscuras. Acto seguido, y debido al mal tiempo, el buque comenzó a ir a la deriva hacia la costa. A las 08:50 horas el Capitán y la tripulación fueron evacuados en helicóptero del Coast Guard, debido al riesgo de incendio de la carga del buque y ante la posibilidad inminente de que el buque embarrara. A la 10:55 horas una ola enorme arrojó al buque contra las rocas de Garth's Ness, lo que ocasionó que comenzase el derrame de petróleo, llegando a verter un total de 85.000 toneladas de crudo y 1.600 toneladas de diésel.¹⁸ Durante las siguientes dos semanas, un temporal con rachas de viento de hasta 80 nudos azotó a toda la zona de la catástrofe, lo que provocó una fuerte contaminación sobre toda costa. El 11 de enero del 1993, el buque se partió y con ello el vertido del crudo se vio incrementado.

Paralelamente empezaron las tareas de limpieza del vertido, en las que se utilizó un avión DC3 para rociar con dispersante el vertido, así como se prepararon barreras, *skimmers* y resto de material necesario para ser utilizado por personal altamente cualificado en las labores de limpieza, pero debido al temporal nada de esto pudo ser utilizado.¹⁸ No obstante, gracias al fuerte oleaje no se pudo formar una capa superficial de crudo, debido a la intensidad y continuidad de las olas, lo que forzó una suspensión vertical y una posterior dispersión por las corrientes, que ayudado por el intenso viento y la volatilidad del fuel, hicieron que arrastrasen el vertido mar adentro. El fuel que contenía el buque estaba clasificado como ligero, denominado Gullfaks, por lo que en los primeros cinco días una tercera parte se evaporó, lo que provocó que el aire de la zona se contaminase por los vapores del crudo, ocasionando en la población de la isla escozor en los ojos y en las mucosas, lo que hizo que los isleños manifestasen congestión, cefaleas, problemas estomacales e incluso asfixia.¹⁸

Esto provocó que se distribuyesen máscaras antigás entre la población y que las autoridades sanitarias de Shetlands realizasen análisis del aire, los cuales determinaron que la cantidad de partículas tóxicas en suspensión y de gases estaban por debajo de los límites establecidos como de riesgo. Aun así se estableció una campaña de chequeos médicos entre los isleños para examinar la función pulmonar, renal y hepática con el fin de determinar si habían sido afectadas por la catástrofe.

La catástrofe del Braer no solo afectó a la salud de las personas, sino que también afectó directamente a la industria marítima de alimentación de la zona, especialmente a la pesca y piscifactorías. Las cifras oficiales indican que se vieron afectadas unas 1.500 aves marinas, que suponían un 35% de la población avícola salvaje de la isla, diez focas grises y cuatro nutrias. Pero no solo la industria marina de alimentación se vio afectada sino que también hubo unas pérdidas de 20 millones de libras de ingresos por el turismo de la zona.

2.3. Sea Empress (Gales, 15 de Febrero de 1996)

El 15 de febrero del 1996, en la entrada de Milford Haven en Pembrokeshire, cerca de la costa suroeste de Gales, encalló el Sea Empress, un buque petrolero monocasco de 142.272 toneladas, con bandera de Liberia, produciéndose el derrame del petróleo de sus tanques y provocando la tercera mayor marea negra de Gran Bretaña y la duodécima más grande en el mundo hasta ese momento.¹⁹

El buque fue cargado en Hound Point (Escocia), con 130.018 toneladas de crudo clasificado como ligero, con dirección a una refinería de petróleo de Texaco cerca de Pembroke (Gales). En el momento del incidente el buque se encontraba en el suroeste de Gales, en “St. Anne’s Head”, una zona que

formaba parte del único parque nacional costero de Reino Unido en ese momento, muy rica ecológicamente al contener: 35 sitios de especial interés científico, una reserva natural marina y dos potenciales zonas especiales de conservación europea, además de ser una importante zona para la pesca y el turismo, sobre la cual en el transcurso de una semana se derramaron 72.000 toneladas de petróleo crudo al mar.²⁰ En la Figura 4 se muestra el lugar del incidente y las zonas afectadas por el vertido del buque.²⁰



Figura 4. Mapa de la zona del hundimiento del Sea Empress y de la zona afectada.²⁰

La causa inicial del accidente fue un error del capitán en el cálculo de las corrientes marinas, pero a esto hay que sumarle las causas secundarias, que fueron el mal tiempo, el uso de remolcadores con insuficiente potencia, y el desconocimiento de las mareas y las corrientes de la zona. En el momento de la catástrofe, los remolcadores de la Autoridad Portuaria de Milford Haven

fueron enviados al lugar del incidente para tirar del petrolero y tratar de reflotarlo, pero en los intentos de rescate iniciales se soltó en varias ocasiones de los remolcadores, provocando que colisionase contra la costa repetidamente.^{19, 20} En la primera colisión se vertieron al mar 2.500 toneladas de petróleo y durante la operación de salvamento del buque se vertieron otras 69.300 toneladas, lo cual agravó la situación. Finalmente, el petrolero fue reflotado y llevado a puerto el 21 de febrero. Posteriormente fue remolcado a un astillero de Belfast para su reparación y continuación de su uso, pero con diferente nombre.

Las 72.000 toneladas de petróleo crudo y 370 toneladas de fuel pesado del vertido del buque impactaron sobre un tramo de 100 km de costa, aunque las estimaciones sugieren que 200 km de costa fueron afectadas. A esto se debe añadir las 25.000 toneladas de residuos generados durante la operación de limpieza. En las tareas de limpieza se utilizaron técnicas agresivas en áreas de un alto valor atractivo, aunque se realizaron técnicas con un enfoque ambiental más consciente en otras áreas, a raíz de las lecciones aprendidas en las tareas de limpieza del vertido de la catástrofe del buque Exxon Valdez, donde se observó que los lavados de alta presión agravaban el problema del petróleo en hábitats más sensibles y alargaban el tiempo de recuperación de los mismos.

A pesar de la magnitud de la catástrofe, se produjeron tres factores que redujeron el impacto del desastre,^{19, 20} que fueron: la época del año en la que sucedió la catástrofe, en la que no había turistas y muchas especies animales habían migrado; las fuertes rachas de viento con dirección norte, que ocasionaron que el 87% del petróleo fuese empujado lejos de la costa; y que el tipo de fuel derramado fuese ligero, el cual es más fácil de dispersar y de tratar químicamente, haciendo que el 24% del petróleo se evaporase por acción de los dispersantes químicos y el 28% por acción natural, del viento y de las olas.

Pero aun así, se estima que entre un 5% y 7% del petróleo, sobre unas 5.300 toneladas y hasta unas 16.000 toneladas de fuel emulsionado, llegaron a las costas, lo que produjo una alta mortalidad en la biodiversidad marina de especies como las lapas y herbívoros gasterópodos. También las poblaciones de estrellas de mar (*Asterina phylactica*) sufrieron una alta mortalidad así como las gambas (*Elegans palaemon*), que también se vieron afectadas. En lo referente a las aves, se vieron afectadas más de 7.000 ejemplares de *Melanitta nigra*. Por el contrario, las poblaciones de focas y cetáceos no se vieron prácticamente afectadas.^{19, 20}

La catástrofe del Sea Empress, le costó a Reino unido un total de 38 millones de libras, de los cuales 28 millones se gastaron en operaciones de limpieza y el resto en pagos por compensación.

2.4. Nadkodka (Japón, 2 de Enero de 1997)

El 2 de enero de 1997, el petrolero ruso Nakhodka, con una carga de 19.000 toneladas de petróleo clasificado como mediano, se partió en dos, a unos 110 km al noroeste de las islas Oki, en el Mar de Japón, cuando realizaba la ruta desde Shanghái (China) a Petropavlovsk (Rusia), produciéndose un vertido de 6.200 toneladas de petróleo al mar, lo que ocasionó una de las peores mareas negras de la historia de Japón.²¹ Al poco tiempo de partirse, la sección de popa, con una carga estimada de 10.000 toneladas de petróleo, se hundió a una profundidad de 2.500 m. Debido a su profundidad, la dispersión marítima del petróleo se vio favorecida. Según las autoridades japonesas, el fuel se fue liberando a una velocidad de entre 3 y 15 m³ diarios. Mientras tanto la sección de proa, con una carga de 2.800 toneladas, continuó a la deriva hacia la costa de Honshu. Tanto el propietario del barco como las autoridades niponas intentaron fijar la proa para evitar su colisión contra la costa, pero la

falta de puntos de fijación y las malas condiciones meteorológicas hicieron que esta operación fracasase. El 7 de enero de 1997 la sección de proa impactó contra la costa a unos 200 metros de la orilla, cerca del puerto de Mikuni, liberando parte de la carga que contenía en su interior y provocando una fuerte contaminación en la costa. El consorcio de armadores formado por las autoridades japonesas, tras varios intentos fallidos debido a las malas condiciones meteorológicas, consiguieron sustraer 1.500 toneladas que permanecían en el interior de la proa mediante pequeños buques cisterna y, a través de una calzada construida para acceder a los restos del naufragio, consiguieron extraer con camiones cisterna el resto del petróleo mezclado con agua. A finales del mes de abril, la empresa propietaria del petrolero se hizo cargo del desmantelamiento de la sección de proa y los residuos asociados, que fueron transportados a Hiroshima para su posterior desguace.²¹

En el catástrofe del *Nakhodka*, hubo dos factores que incidieron negativamente. Uno de ellos fue que, mientras la mayoría de las catástrofes de los petroleros se originan por colisiones cercanas a la costa, esta ocurrió a más de 100 km, lo que expuso al petróleo vertido a fuerzas de la naturaleza tales como fueron el viento y las corrientes marinas, generando un arco que se extendió a 20 km hacia el norte, a lo largo de la península de Noto, por lo que las costas de Hyogo y Kyoto también se vieron fuertemente afectadas, mientras que Niigata, Yamagata y Akita solamente se vieron afectadas principalmente por bolas de alquitrán. El segundo factor fue el tipo de fuel que transportaba el buque, clasificado como mediano, el cual formó emulsiones muy estables, persistentes y resistentes a la degradación física por acción de las olas del mar, ocasionando un aumento en la contaminación, unido a que la persistencia del petróleo emulsionado le permitió desplazarse hasta grandes distancias.²¹ En la Figura 5 se muestra el lugar del incidente y las zonas afectadas por el vertido del buque.²²

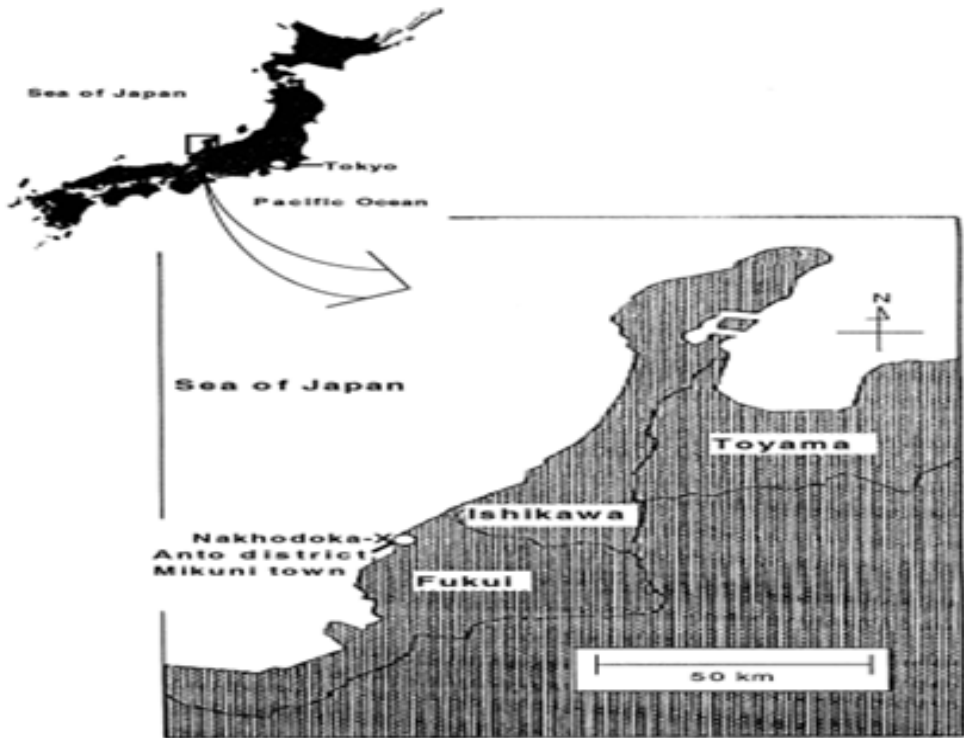


Figura 5. Mapa de la zona del hundimiento del Nakhodka y de la zona afectada.²²

En las actuaciones de limpieza participaron más de 80 buques pertenecientes a la Agencia Marítima de Seguridad (MSA) y a las Fuerzas de defensa Japonesas. La Marina Mercante de Rusia envió cuatro buques equipados con sistemas de recuperación de petróleo para ayudar a la MSA. El Centro de Prevención de Desastres Marinos (MDPC) fletó barcos-grúa para recoger el petróleo de la superficie del mar que se había emulsionado y se había vuelto altamente viscoso. Asimismo, cientos de pescadores se movilizaron para recoger el petróleo manualmente.²¹ También se pulverizó la

zona con dispersante, a través de helicópteros, para tratar el petróleo que vertía la sección de proa. La limpieza de las costas se llevó a cabo principalmente mediante medios manuales. En las cinco principales zonas de contaminación costera llegaron a ir unas 500.000 personas al día, principalmente voluntarios de todo Japón.²¹

Se estima que la cantidad total de residuos recogidos fueron de unas 50.000 toneladas, que fueron transportadas por carretera, ferrocarril y por mar a las instalaciones de eliminación industriales, plantas de incineración, de todo Japón.²¹

Desde una perspectiva internacional fue llamativa la respuesta de los voluntarios procedentes de todo Japón y los esfuerzos por eliminar el fuel de las costas afectadas, siendo esta la mayor contribución en la historia de las mareas negras desde el Torrey Canyon en el año 1967.²¹ En muchas regiones a lo largo de la costa contaminada, muchos residentes y voluntarios trabajaron sin apenas descanso, lo que produjo en diversas zonas como fue la de Anto, que muchas de las personas que participaban en las tareas de limpieza tuvieran que ir aquejados de diferentes síntomas (dolores de cabeza, irritaciones en ojos y garganta, problemas respiratorios, dermatitis, etc...) a los puestos de socorro instalados por el gobierno local y por asociaciones médicas. En Kyoto y en Ishikawa, cuatro trabajadores murieron a causa de un ataque al corazón o un derrame cerebral durante las tareas de limpieza, lo cual fue compensado por el gobierno japonés como accidente laboral.²² Estos datos nos ponen de manifiesto los riesgos y los efectos negativos sobre la salud de las personas, que conlleva el hecho de estar expuestos a vertidos de hidrocarburos.

2.5. Erika (Francia, 12 de diciembre de 1999)

El 12 de diciembre de 1999 el petrolero Erika, con bandera de Malta, de unos 183 metros de eslora y una capacidad de carga de hasta 37.000 toneladas, se hundía tras partirse en dos frente a las costas de Francia, cuando realizaba el recorrido desde Dunquerque (Francia) hasta Livorno (Italia). El hundimiento fue ocasionado por una mezcla de factores como fueron un fuerte temporal, problemas estructurales del casco y el efecto natural del desgaste del buque, que contaba con una edad de 25 años. En el momento de la catástrofe el buque iba cargado con 32.000 toneladas de fuel pesado clasificado como número 6, de las que aproximadamente 10.000 toneladas fueron vertidas, lo que provocó un desastre ecológico contaminando unos 400 km de costa.¹⁵ En la Figura 6 se muestra el punto donde el buque Erika se hundió y la zona afectada por el vertido.²³



Figura 6. Mapa de la zona del hundimiento del Erika y de la zona afectada.²³

El problema del hundimiento del Erika se vio agrandado al producirse el vertido cerca del estuario del Loira, zona protegida por su riqueza

medioambiental, quedando 15.000 aves atrapadas por el vertido. En los centros de atención de aves marinas se atendieron más de 12.000 aves y se estimó que un total de 30.000 aves perdieron la vida, lo cual fue un impacto negativo considerable en las colonias de aves marinas. A esto se debe sumar el impacto ambiental producido en las costas afectadas y en la flora y fauna marina.²⁴

En lo relativo a las tareas de limpieza, la utilización de disolventes fue imposible por la consistencia del producto vertido, ya que era demasiado viscoso y se había emulsionado con el agua, por lo que la única opción fue arrastrar con dos barcos una especie de barrera con el fin de recoger las placas espesas para posteriormente calentarlas y así poder bombearlas. Esta actividad fue sólo relativamente efectiva, ya que para poder desempeñarla correctamente el mar debe de estar tranquilo y en los días posteriores al hundimiento el temporal aún no había remitido. No obstante, siguiendo el plan *Polmar*, que es el plan de intervención francesa que se activa en caso de contaminación marina accidental, gran número de barcos se movilizaron para recoger el fuel derramado, pero solo se pudieron recoger 1.100 toneladas. Asimismo el plan realizó hincapié en la limpieza de las costas y playas de manera manual o con dispositivos mecánicos que no hiciesen mayor daño que el propio petróleo. Para ello gran número de voluntarios, operarios públicos e incluso el ejército participaron en las operaciones de limpieza. Esta catástrofe desencadenó una serie de medidas conocidas como Erika I, Erika II²⁴ y Erika III²⁵ por parte de la Comisión Europea, para evitar que desastres así se vuelvan a producir.

Ocho años después del hundimiento, en enero de 2007, el tribunal correccional de París dictaba sentencia condenando a Total, al armador, al gestor del petrolero, y a la sociedad italiana de certificación Rina, responsable

de las inspecciones técnicas del buque, a pagar colectivamente 192 millones de euros en indemnizaciones a las víctimas de la marea negra producida por el hundimiento del Erika. En la misma sentencia, el capitán y los oficiales del servicio de salvamento, acusados de negligencia, fueron absueltos.²⁶

3. Historia específica de la catástrofe “Prestige”

El 13 de noviembre de 2002, el petrolero monocasco Prestige con bandera de conveniencia de Bahamas, mientras transportaba una cantidad de 77.000 toneladas de fuel desde San Petersburgo (Rusia) y Ventspils (Letonia) a Singapur, a su paso por la costa noroeste de España frente a la Costa de Finisterre lanzó una señal de SOS, requiriendo la evacuación parcial de su tripulación debido a un grave daño sufrido en el casco. Tras varios días de maniobra para intentar su alejamiento de la costa gallega acabó hundiéndose a unos 250 km de la misma, con el subsiguiente vertido de parte su carga. El vertido del fuel que transportaba causó una de las mayores catástrofes medioambientales de la historia de la navegación, liberando 50.000 toneladas de petróleo²⁷ que afectaron desde el norte de Portugal hasta las Landas de Francia. El episodio tuvo una especial incidencia en Galicia, donde sus efectos fueron devastadores tanto a nivel de daño ecológico como a nivel económico. La catástrofe del Prestige ha sido considerada como el tercer accidente más costoso de la historia por detrás de la desintegración del Columbia y el accidente nuclear de Chernobyl,²⁸ debido a que la limpieza del vertido y el sellado del buque tuvieron un coste de unos 12.000 millones de euros, de los cuales 4.000 millones de euros procedieron de las arcas públicas del gobierno español.²⁷

3.1. El Barco: el petrolero *Prestige*

El buque *Prestige*, anteriormente llamado *Mt Gladys*, era un petrolero monocasco del tipo Aframax 40, construido en 1975 en los astilleros de Hitachi Shipbuilding & Engineering Co. en Maizuru (Japón) y botado al mar el 1 de marzo de 1976, con una capacidad de carga de 100.813 m³. El buque tenía registro griego y navegaba con bandera de conveniencia de Bahamas. El propietario del barco era la compañía *Mare Shipping* de Liberia, explotado por la naviera griega *Universe Maritime* y su carga era propiedad de la compañía petrolera rusa *Crown Resources*, con sede en Suiza. El buque tenía 243.5 m de eslora, 34.4 m de manga, 18.7 m de puntal y 14 m de calado a plena carga, propulsado por un motor diésel B&W de 14.711 kilovatios de potencia acoplado a una hélice de palas fijas. El petrolero estaba certificado por la sociedad de clasificación estadounidense *American Bureau of Shipping* y asegurado por la compañía *The London Steamship Owner's Mutual Insurance Association*, del Reino Unido. Se trataba de un petrolero pre-MARPOL, es decir un buque sin tanques de lastre segregados. En la Figura 7 se muestra la disposición de los tanques.²⁹

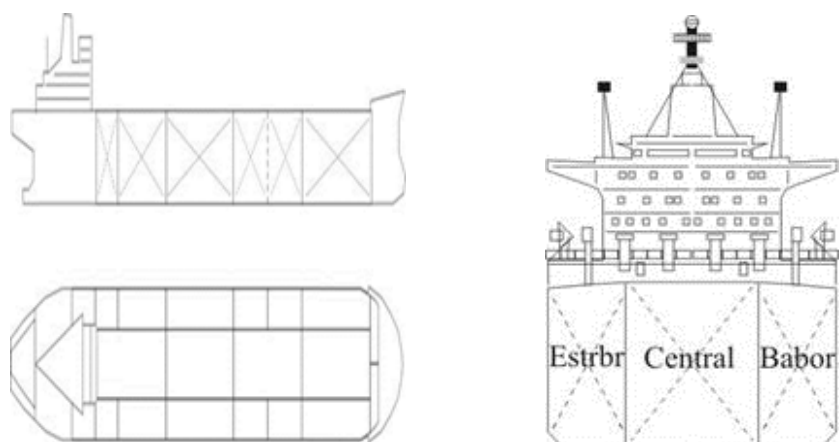


Figura 7. Secciones longitudinal y transversal del buque *Prestige*²⁹

El *Prestige* contaba, en el viaje del fatal accidente, con una tripulación total de 27 personas, de las cuales 2 eran de nacionalidad griega, el capitán y el jefe de máquinas, 24 filipinos, los cuales eran 6 oficiales, 3 de puente y 3 de máquinas, y un marinero rumano. Todos ellos contaban con la titulación válida, de acuerdo con el convenio internacional STCW 78/95 que regula las normas básicas de formación de los marinos embarcados. Menos el capitán y el jefe de máquinas, el resto de la tripulación eran contratados a través de una agencia con sede en Manila, filial del grupo naviero encargado de explotar el *Prestige*. La tripulación mínima de seguridad (*Safe Manning*), de acuerdo con el certificado correspondiente, la formaban 7 oficiales y 7 especialistas de cubierta y máquinas. El idioma utilizado a bordo era el inglés.²⁹

3.2. La carga del *Prestige*

El producto petrolífero transportado por el *Prestige* era un fuel pesado, que se utiliza para dos tipos de aplicaciones: la combustión industrial (centrales térmicas, hornos, cementeras, etc.) y el suministro de barcos propulsados por motores diesel lentos, de gran potencia.³⁰

La capacidad de carga del buque era de 81.589 toneladas. Sin embargo, el barco transportaba 76.972,95 toneladas de fuel de alta densidad y viscosidad tipo B2 (según los datos M-100). El producto, de elevada densidad (0.99 g/cm³) y viscosidad (615 centiStokes a 50°C y 30000 centiStokes a 15°C), tenía la siguiente composición elemental: Carbono (86,8%), Hidrógeno (11,0%), Azufre (2,28%) y Nitrógeno (0,69%). Estaba constituido por un 22% de hidrocarburos saturados, 50% de hidrocarburos aromáticos y un 28% de resinas y asfaltenos. Se trata, por tanto, de un residuo de tipo naften-

aromático.³¹ En la Tabla 2 se muestra la composición del fuel vertido por el petrolero Prestige y la toxicidad de sus componentes.³²

Tabla 2. Composición del fuel del Prestige y toxicidad descrita de sus componentes³²

	Composición	Toxicidad
Hidrocarburos aromáticos (50%)	Volátiles: benceno, tolueno, xileno Policíclicos: naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoranteno, criseno y alquil-derivados De elevado peso molecular: benzofluorantenos, perileno, benz[a]antraceno, benzo[e]pireno, benzo[a]pireno, etc.	Síntomas agudos (respiratorios, neurovegetativos). Carcinógenos Posibles carcinógenos. Alteraciones endocrinas. Irritantes de piel y mucosas Probables carcinógenos. Irritantes cutáneos
Hidrocarburos saturados (22%) Resinas y asfaltenos (28%) Heteromoléculas con átomos de azufre, oxígeno, nitrógeno, metales pesados (cadmio, plomo, níquel)		Alteraciones endocrinas. Carcinógenos

3.3. Las causas del accidente del Prestige

El petrolero Prestige, de 26 años de edad, se encontraba en mal estado, especialmente los tanques de lastre 2 y 3 que presentaban altos índices de corrosión y deformaciones en su estructura. Estos tanques habían sido reparados dos veces, la primera en 1996 en Alemania y la segunda en Cantón (China), la cual estuvo ligada a la catástrofe ya que se utilizó como base de una acusación frustrada frente a la empresa certificadora American Bureau of Shipping.³³ En mayo de 2001 fue realizada una inspección que reveló la corrosión que sufrían los mamparos de los tanques de fuel, de tal grado que precisaban la sustitución de al menos 1.000 toneladas de acero. Los propietarios del Prestige consiguieron rebajar esta cifra a 600 toneladas, y la propia American Bureau of Shipping rebajó el arreglo de acero a 362

toneladas. Pero según las actas del astillero chino, solo se sustituyeron 282 toneladas. En el año 1999 el buque fue sancionado en New York y Rotterdam por distintos errores graves de seguridad, y la Asociación Española de Operadores de Productos Petrolíferos lo tenía vetado. Posteriormente, en mayo de 2002 el barco fue revisado de nuevo en Dubai, pero esa inspección no comprobó el estado de la corrosión de los mamparos de los tanques 2 y 3 de lastre.³³

Se cree que se produjo una grieta inicial de unos 15 m en la zona dañada, provocando la inundación de dos tanques del costado de estribor debido a un fallo en el forro externo del costado y en la unión de un mamparo transversal, a la altura de la cubierta, generando que el buque escorara a 25° estribor. La grieta inicial alcanzó una tamaño de 40 m en sólo 2 días, con la pérdida de varias tracas del forro exterior de costado y de cubierta. Se cree que esto fue debido al fuerte temporal, la acción del mar, la carga sobre la estructura dañada y las deformaciones sobre la estructura realizadas en las operaciones de adrizamiento y remolque del petrolero. Finalmente se produjo la rotura de los tanques, y el 19 de noviembre a las 8:00h el buque se partió en dos por la maestra y en menos de cuatro horas se hundió, quedando separados a unos 3,7 Km una parte de la otra en el fondo marino.³³

3.4. Cronología del hundimiento de Prestige

El 5 de noviembre del 2002, el Prestige partió del Puerto de Riga, capital de Letonia, con 27 tripulantes. En el transcurso de su navegación, el 13 de noviembre, a 28 millas de Finisterre, dos tanques de lastre vacíos a estribor próximos a la maestra (la sección transversal que corresponde a la manga máxima) se inundaron por una vía de agua provocando que el buque escorase y quedase a la deriva. A las 15:15h el capitán del petrolero lanza una señal de

SOS para solicitar la evacuación de parte de la tripulación debido al daño que sufre el barco. Una hora después, 24 miembros de la tripulación fueron evacuados en helicóptero y también aparece el primer vertido de fuel estimado en 6.000 toneladas; ese mismo día, la compañía Smit Co. se hace cargo del rescate. Al día siguiente el barco, que va a la deriva dirección sureste, se acerca a menos de 4 millas de Muxía (A Coruña, comarca de Fisterra), por lo que se encienden los motores auxiliares y lo remolcan hacia el norte a una velocidad de 6 nudos; en ese momento ya se aprecia la grieta de unos 15 cm que afecta a los dos tanques del costado de estribor y se intenta corregir la escora con una contra-inundación de los tanques a babor. El 15 de noviembre, se decide cambiar el rumbo del barco hacia el sur, cuando estaba a 65 millas de la costa. Ese día la grieta del casco ya había alcanzado los 40 m, por lo que se apagan los motores y son evacuados el capitán y el resto de la tripulación. El 16 de noviembre, se continúa remolcando el petrolero hacia el sur y a 50 millas de la costa se vacía otro tanque, con un nuevo vertido de aproximadamente 4.000 toneladas. Al mismo tiempo llega a las costas la primera marea negra, contaminando 190 Km de costa. Al día siguiente, cuando está a unas 60 millas de la costa a la altura de Corrubedo (municipio de Riveira, A Coruña), se rompe otro tanque, que produce un nuevo vertido. El 18 de noviembre, al alcanzar aguas portuguesas, a unas 100 millas de la costa, es obligado por las autoridades portuguesas a virar de nuevo al norte. Ese mismo día, se cae el palo de estribor del buque debido a los daños que afectan a la cubierta y se producen nuevos derrames procedentes de otro tanque. Finalmente el 19 de noviembre de 2002, a las 8:00h el buque se parte por la maestra a 133 millas de Fisterra; a las 12:00 h se hunde la popa, y la proa unas cuatro horas después. La fractura produce daño en otros tanques y se producen nuevos vertidos estimados en 11.000 toneladas de fuel.³⁴ En la Figura

8, se muestra la ruta seguida por el Prestige desde que manda la señal de SOS hasta su hundimiento.³⁵

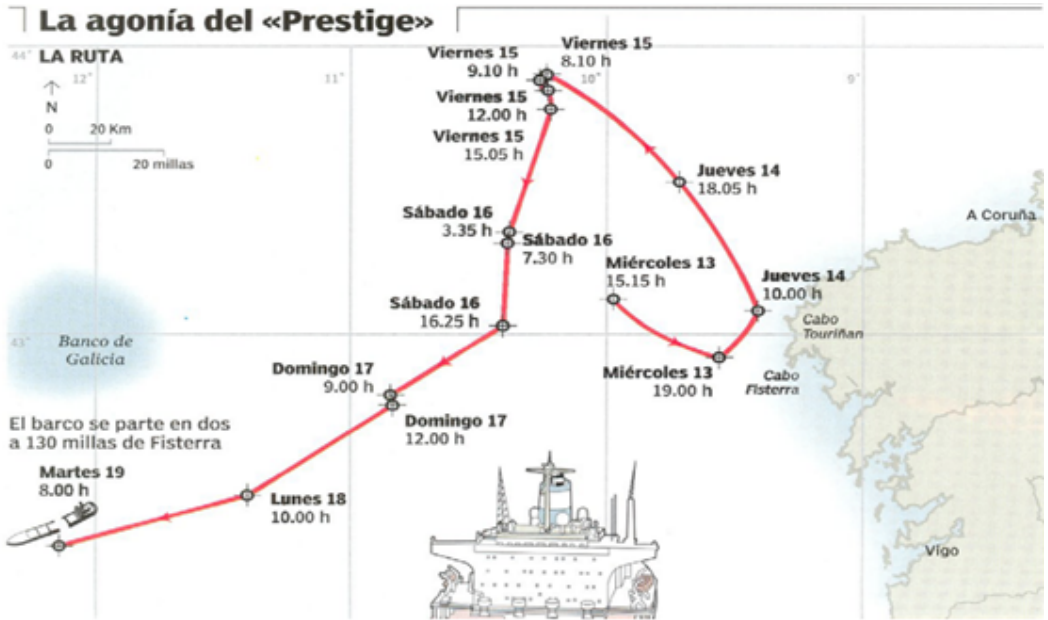


Figura 8. Ruta del hundimiento del Prestige³⁵

3.5. Las consecuencias de la marea negra

El impacto ecológico que produce un vertido de petróleo de estas características ocasiona efectos a corto, medio y largo plazo. Estos efectos ecológicos se traducen de manera indirecta en costes económicos, sociales y culturales, que producen una alteración de la estructura y dinámica del sistema, de muy difícil predicción cuantitativa y muy relevante desde el punto de vista ecológico y económico. El vertido de fuel del petrolero Prestige afectó

a unos 2.500 Km de litoral, desde Portugal hasta Francia, de los cuales unos 1000 Km pertenecen a las costas de Galicia.³⁶

En lo relativo a los daños causados en la fauna y flora marina, la película de fuel sobre el mar produce falta de luz y reduce el aporte de oxígeno al ecosistema marino, contaminado o matando al plancton, el cual está formado por multitud de microorganismos que viven cerca de la superficie y que constituyen la base de toda la cadena alimentaria.

En lo que se refiere al daño producido por el vertido en las aves, se cuantificó a 16 de febrero de 2003 que 21.538 ejemplares de aves fueron recogidos en la fachada atlántica, de los cuales 15.977 estaban muertas y 5.561 vivas. No obstante, según la Sociedad Española de Ornitología SEO/BirdLife, se calcula que el número real de ejemplares muertos se situaría entre 115.000 y 230.000, debido a la extrema dispersión del contaminante en la plataforma continental y a su persistencia en el tiempo en la lámina de agua,³⁶ lo que lo convierte en uno de los mayores episodios de mortalidad no natural de aves marinas a nivel mundial. No solo las aves se vieron afectadas por la contaminación sino que también afectó a una gran parte de los criaderos de fitoplancton, algas, peces y marisco de la costa atlántica. Los mamíferos, como los delfines o marsopas, también se vieron afectados, y prácticamente la totalidad de las especies de peces y mariscos fueron asimismo afectadas por la marea negra.³⁶

En las costas gallegas, alrededor de 1.000 Km fueron afectados por el vertido del Prestige, siendo el 52% del litoral gallego zona protegida. Muchos humedales costeros y marinos fueron gravemente afectados por las mareas negras, algunos de ellos de gran relevancia como fueron los espacios protegidos de Baldaio, Traba, el monte Louro, las islas Sisargas y la Costa da Morte, que comprende desde cerca de Malpica hasta Fisterra, con una

extensión de litoral de 152 Km, siendo la Costa da Morte la zona más afectada por la marea negra del Prestige. Todos estos espacios protegidos habían sido designados por la Xunta de Galicia como lugares de Importancia Comunitaria y destinados a formar parte de la Red Natura 2000 europea. En la Figura 9, se muestra el mapa del litoral afectado por el vertido del Prestige.³⁷

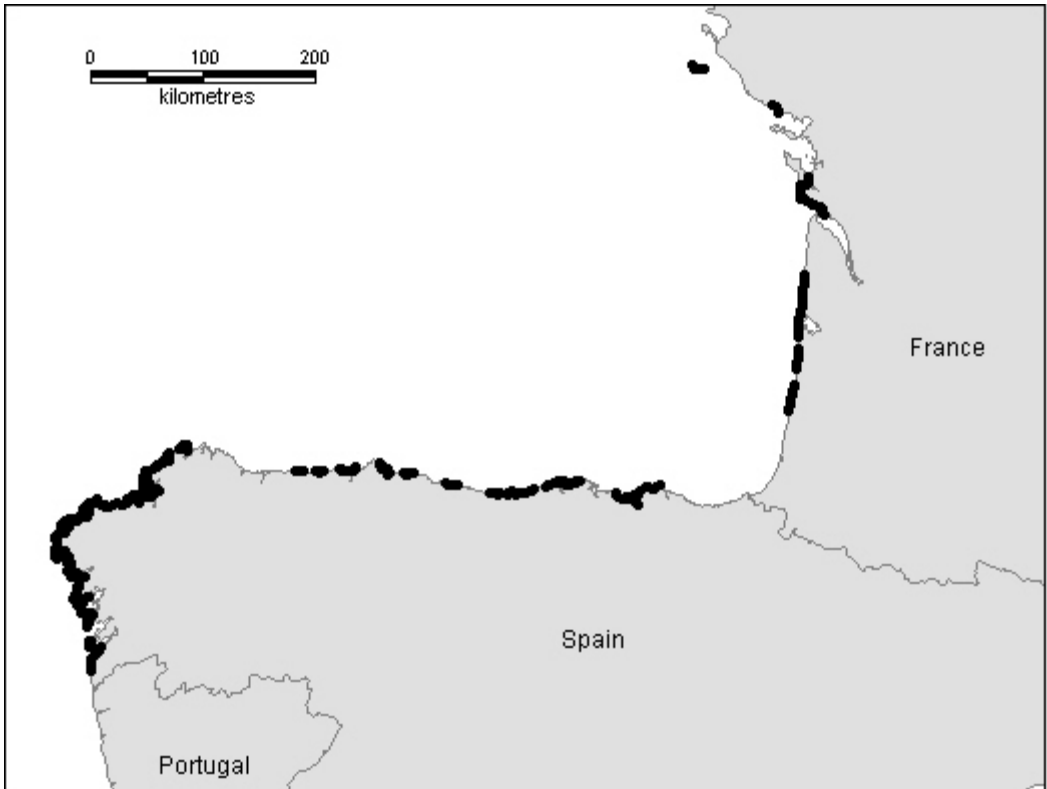


Figura 9. Mapa del litoral afectado por el vertido del Prestige.³⁷

3.6. Actuaciones frente a los daños ocasionados por la marea negra

El éxito de la campaña de limpieza fue debido al esfuerzo realizado por los marineros de las zonas afectadas, los voluntarios y la administración, que consiguieron que en el verano del 2003 el 98% de las playas estuvieran recuperadas. Para llevar a cabo estas labores de limpieza se movilizaron más de 300.000 voluntarios que llegaron a las costas gallegas procedentes de Galicia, de diversos puntos de España y otros países de Europa. La limpieza se realizó con medios manuales y mecánicos (uso de pala, arado, y tamices de diferente luz), en función de la densidad y el tamaño de los residuos, y para las zonas rocosas se utilizaron sistemas de lavado a presión con agua marina.³⁵

Para la sustracción del petróleo que estaba depositado en el interior de los restos del Prestige hundidos en el fondo del mar, se utilizó un sistema innovador desarrollado por Repsol S.A, que consistió en utilizar cinco grandes bolsas lanzaderas, de 23 metros por 4,7 metros y con una capacidad de 300 m³. Esta operación fue dirigida desde el barco Polar Prince, al cual daban soporte tres robots submarinos ROV, que maniobraban los contenedores sobre cuatro orificios que se realizaron en el casco y contaban con válvulas de seguridad. Estos contenedores lanzadera descendían hasta el fondo gracias a unas cadenas de lastre y, una vez llenos, ascendían flotando. Cuando llegaban a unos 60 m de profundidad se bombeaba su contenido a otro barco, un petrolero noruego (Odín). Asimismo para la eliminación del resto de contenido adherido a las paredes de los depósitos del buque se utilizaron microorganismos capaces de degradar el fuel.³⁸

3.7. Consecuencias económicas y sociales de la catástrofe del Prestige

Tras el desastre del Prestige, los efectos negativos se sintieron de inmediato en las bases de la economía local, como son: pesca, marisqueo, acuicultura, sector turístico y servicios. Otra de las consecuencias indirectas de la catástrofe es el desplazamiento de la población al acelerarse los procesos de migración hacia el interior, especialmente en Galicia, lo que generó un cambio de actividad y un proceso de despoblación en ciertas áreas.³⁹

Cuando la macrocausa judicial del Prestige celebrada en España finalizó, después de casi 10 años de instrucción, 9 meses de juicio oral y con más de 2.000 partes personadas, 133 testigos y 98 pruebas periciales, los únicos cuatro acusados en el caso, Apostolos Mangouras (el capitán), Nikolaos Argyropoulos (jefe de máquinas), Ireneo Maloto, (otro mando del buque) y José Luis López-Sors (exdirector de la Marina Mercante), el único cargo público imputado, fueron absueltos de los cargos de delitos contra el medioambiente, daños en espacios naturales protegidos y otros cargos a lo largo del proceso, a excepción del capitán del barco, Apostolos Mangouras, que fue inculcado como autor criminalmente responsable de un delito de desobediencia grave a la autoridad, por el cual fue condenado a 9 meses de prisión.⁴⁰ Por el contrario la compañía certificadora *American Bureau of Shipping* no fue incluida en esta demanda, pero sí fue interpuesta una demanda ante los tribunales estadounidenses, que fue desestimada posteriormente.

En su conjunto, las consecuencias originadas por la catástrofe del Prestige generaron un gasto de 12.459 millones de euros, incluyendo en dicho coste por una parte las tareas de limpieza y recuperación de las zonas afectadas y por otro lado las pérdidas de actividades económicas.³⁹ Esta estimación no incluye los costes intangibles que se produjeron en la población de las zonas afectadas.

4. Consecuencias generales de la exposición accidental a hidrocarburos

La historia de las catástrofes producidas en el transporte de hidrocarburos muestra el daño producido en el ecosistema de las diferentes zonas afectadas, en las que consecuentemente se han visto perjudicadas la fauna y la flora, tanto marítima como costera, produciendo un impacto negativo no sólo inmediato sino también a largo plazo. Esto provoca un fuerte impacto negativo en la actividad laboral y económica de sectores que dependen directa o indirectamente del mar.

Las catástrofes marítimas en el transporte de hidrocarburos no solo han afectado al ecosistema y a la economía, sino que también han afectado a la salud de las personas que se han visto envueltas de una manera u otra en medio de estas catástrofes, teniendo consecuencias en su salud a corto y largo plazo debido principalmente a su exposición a los compuestos volátiles orgánicos (*volatile organic compounds*, VOCs) de los hidrocarburos. En la literatura sobre de las consecuencias de estas catástrofes, se hallan extensos estudios sobre los impactos económicos y medioambientales que a modo general produce un acontecimiento de esta índole, pero no se ha conducido ninguna investigación general y amplia sobre el impacto en la salud humana. En esta última faceta, la información generada y publicada es sorprendentemente escasa. Por ello, el intento de cuantificar y valorar las consecuencias generales en la salud de la exposición a VOCs de vertidos de hidrocarburos está sujeto a la revisión de estudios limitados, realizados principalmente para analizar los síntomas y efectos a corto plazo tras cada una de las principales catástrofes marítimas ocurridas mencionadas en los dos apartados anteriores. Una revisión sistemática sobre esta materia ha sido realizada y publicada por G. Rodríguez Trigo,³² en la cual se evalúan

adicionalmente los resultados obtenidos en el estudio realizado para valorar los efectos sobre la salud de la exposición al fuel de la catástrofe producida por el hundimiento del buque *Prestige*. A continuación se revisan resumidamente los sucesivos estudios publicados a raíz de cada una de las catástrofes marítimas ocurridas, para posteriormente compilar de forma general las consecuencias producidas sobre la salud.

En un estudio epidemiológico transversal realizado por Palinkas et al,⁴¹ dos años después de la catástrofe del *Exxon Valdez* en 1989 en Alaska, sobre una muestra de 599 sujetos, se observaron problemas psicológicos como son trastorno de ansiedad, depresión y estrés postraumático. En 1993, después del naufragio del buque *Braer* en las costas escocesas, Campbell et al.⁴² realizaron un estudio transversal con un grupo control en un total 512 sujetos, donde se midió el flujo espiratorio pico, distintos parámetros en sangre y orina, y se completaba un cuestionario. En los resultados se observó picor de ojos, cefalea, dolor de garganta y dermatitis. A los seis meses se repitió el mismo estudio y el grupo de expuestos al fuel manifestaron una prevalencia mayor de irritación faríngea y en general un empeoramiento en su salud. Asimismo, J. Cole et al.⁴³ llevaron a cabo un estudio para evaluar el daño genético que puede ocasionar la exposición al fuel, frente a un grupo control. En los resultados no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos. Tres años después, en 1993, Lyons et al.⁴⁴ realizaron un estudio transversal con 1089 sujetos de los cuales 539 habían estado expuestos al fuel derramado por el buque *Sea Empress* en Gales. Los resultados mostraron que los sujetos del grupo expuesto padecían cefalea, dolor de garganta y dolor ocular. En Japón, después del naufragio del petrolero *Nakhodka* en 1997, Morita et al.²² realizaron un estudio epidemiológico donde se valoraron los efectos de la exposición de 282 sujetos, todos ellos participantes en la limpieza del fuel, por lo que no había un grupo control. Los resultados mostraron variabilidad de los

síntomas en función del número de días trabajados, el contacto directo con el fuel y el género. Los síntomas más frecuentes se manifestaron en mayor medida en las mujeres y fueron cefalea, escozor faríngeo, escozor conjuntival y dolor de espalda y piernas. Un estudio similar al realizado en Japón se realizó en 1999 en Francia después del naufragio del petrolero Erika, donde Schovoerer et al.⁴⁵ realizaron un estudio epidemiológico transversal en 1465 sujetos, todos implicados en las tareas de limpieza del fuel. De nuevo se observó una variabilidad de los resultados en función de los días trabajados, y los síntomas más frecuentes fueron dolor lumbar, cefalea, dermatitis, irritación ocular, problemas respiratorios y náuseas.

En el año 2003, Suárez et al.⁴⁶ realizaron un estudio transversal mediante cuestionarios en 799 sujetos para evaluar los problemas agudos de salud producidos por el fuel vertido por el petrolero Prestige tras su hundimiento frente a la costa gallega. Todos los sujetos habían estado en contacto con el fuel mediante diversas tareas de limpieza, incluyendo limpiadores de pájaros, voluntarios, marineros y limpiadores contratados, por lo que no hubo presencia de un grupo control. Se muestra nuevamente una variabilidad de los resultados en función de los días trabajados, de las horas por día trabajado, del contacto directo con el fuel y de haber percibido olores desagradables. Los síntomas más frecuentes fueron: escozor faríngeo, cefalea, irritación conjuntival, problemas respiratorios y síntomas neurovegetativos como náuseas y vómitos.

En el mismo año, 2003, Gestal Otero et al.⁴⁷ realizaron un estudio epidemiológico longitudinal de campo mediante cuestionarios con seguimiento de 5 días, a los 4 y 6 meses después del hundimiento del Prestige, en voluntarios y trabajadores contratados para la limpieza del fuel en la zona de costa más afectada por el vertido: la zona de Muxía, Carnota, Fisterra y Porto do Son. Los síntomas más frecuentes fueron cefalea, dolor de espalda,

irritación conjuntival, molestias faríngeas, mareos, problemas respiratorios y dermatitis. En este estudio no se manifestó una clara variabilidad de los resultados en función del tiempo en días trabajados ni del contacto directo con el fuel.

De los estudios comentados se deduce que las catástrofes producidas en el transporte marítimo de hidrocarburos tienen consecuencias directas sobre la salud de las personas, debido a la exposición accidental a este tipo de sustancias. En todos los estudios se observa que los síntomas más frecuentes producidos de modo general a corto plazo son síntomas irritativos en conjuntivas y faringe, dermatitis, síntomas neurovegetativos (cefaleas, mareos y náuseas) y problemas respiratorios.

5. Efectos de la inhalación de hidrocarburos

La capacidad de la contaminación ambiental para producir enfermedad respiratoria ha cobrado un importante interés.⁴⁸ Se conoce que determinados productos de distinta naturaleza pueden causar un daño agudo en el tracto respiratorio en función de sus características fisicoquímicas.^{47, 49-51} En exposiciones tóxicas inhalatorias accidentales o por terrorismo, como en el caso Bhopal (escape de gas de una factoría química de Union Carbide India Ltd., considerado el peor accidente industrial de la historia) o el ataque a las Torres Gemelas del World Trade Center de Nueva York respectivamente, se ha comprobado que, adicionalmente al daño agudo, se producen problemas respiratorios persistentes y se originan secuelas crónicas.⁵² Actualmente no se conocen los mecanismos implicados en la cronicidad de patología respiratoria tras exposición tóxica puntual. En la catástrofe de las Torres Gemelas de Nueva York se ha comprobado que existía un exceso de citoquinas liberadas

por los macrófagos alveolares, dando lugar a una situación de inflamación persistente.⁵³

En nuestra geografía, una situación accidental que dio lugar a una importante inhalación de sustancias tóxicas fue la derivada de las labores de limpieza tras el derrame de fuel del buque *Prestige* en la costa de Galicia, en noviembre del 2002. Dicho buque vertió cerca de 77.000 toneladas de fuel de elevada viscosidad conteniendo una mezcla de sustancias tóxicas, incluyendo hidrocarburos aromáticos como el benceno y tolueno, metales pesados como el níquel, zinc y vanadio, y azufre.^{31, 54} Al igual que en otros accidentes similares, como fueron el *Exxon Valdez* (Alaska, 1989),⁵⁵ el *Sea Empress* (Inglaterra, 1996),⁴⁴ *Nakhodka* (Japón, 1997)²² o *Erika* (Francia, 1999),⁴⁵ fueron muy frecuentes los síntomas irritativos cutaneomucosos, respiratorios y digestivos, pero apenas existe información desde el punto de vista de su patogenia. Tampoco existen datos consistentes en trabajadores de la industria expuestos a estos tipos de productos; solamente existen aisladas investigaciones de lavado nasal en sujetos que tras el contacto con derivados de petróleo mostraron altos niveles de vanadio y un estado inflamatorio neutrofílico con elevación de interleuquina (IL-8) y mieloperoxidasa.⁵⁶ Estos infiltrados inflamatorios podrían superponerse a los hallazgos encontrados en la fase aguda en trabajadores de limpieza de las costas expuestos al fuel del buque *Prestige* en Galicia, en los que se demostró que existían además cambios citogenéticos y alteraciones hormonales sistémicas.⁵⁷

Aparte del conocimiento limitado sobre la naturaleza del daño agudo tras la exposición, no hay datos sobre si el daño tisular y la actividad inflamatoria se mantienen y, en caso de que persistan, en qué grado. En un estudio realizado sobre 6.780 marineros pertenecientes a las zonas de Galicia que fueron afectadas por el vertido del *Prestige*, se demostró una elevada prevalencia de

síntomas respiratorios en los sujetos que trabajaron en las tareas de limpieza de costas, dos años después de la exposición al fuel.⁵⁸ En estos sujetos se encontró asimismo un mayor nivel de estrés oxidativo,^{59, 60} hiperreactividad bronquial,^{32, 46, 60-62} incremento de la concentración en condensado de aire exhalado de las citoquinas IL-2, IL-8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón gamma (IFN- γ), y de los factores de crecimiento vascular VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y FGF (*fibroblast growth factor*),^{62, 63} así como un mayor riesgo de alteraciones en la estructura cromosómica de los linfocitos circulantes, con una relación dosis-dependiente con la intensidad de la exposición al fuel.⁶² Este conjunto de datos sugiere la existencia de un mecanismo patogénico inflamatorio y un probable proceso de remodelación patológica de tejidos pulmonares, cuya actividad persiste dos años después tras la exposición al fuel.

Cinco años después de la catástrofe del Prestige, se repitió el estudio realizado dos años después del hundimiento del petrolero en los marineros que habían mostrado un riesgo elevado de síntomas respiratorios en el estudio previo y que habían participado en las diferentes actividades de limpieza del fuel del petrolero hundido frente a las costas gallegas.⁶⁴ En el estudio se realizaron encuestas telefónicas a 501 marineros que habían estado expuestos al fuel y a 177 que no habían estado expuestos. En los resultados se mostró que la prevalencia de síntomas en vías respiratorias inferiores, incluyendo disnea, tos, sibilancias y expectoración habían disminuido ligeramente en los dos grupos, pero permaneció superior en el grupo de los marineros que habían estado expuestos al fuel. Se comprobó de nuevo que el riesgo de tener un síntoma respiratorio persistente aumentaba con el grado de exposición. Los hallazgos de este estudio, tal como señalan sus autores, sugieren que la participación en la limpieza del fuel derramado, durante un periodo de tiempo prolongado y sin el material y la protección adecuados, puede producir efectos

negativos sobre el sistema respiratorio que persisten hasta 5 años después de la exposición al fuel.

En consecuencia, este conjunto de resultados y la necesidad de profundizar en el conocimiento de sus mecanismos, planteó la necesidad de un análisis experimental de mecanismos patogénicos mediante un modelo animal de exposición al fuel, cuyos datos pudieran contribuir a guiar posibles decisiones durante el seguimiento de los sujetos afectados por la catástrofe del buque *Prestige* u otras situaciones similares.

6. Sumario y planteamiento general del estudio

En las últimas décadas, el petróleo se ha posicionado como una de las materias primas más demandadas a nivel mundial, lo que ocasiona que sean una de las principales fuentes del comercio internacional. La oferta y la demanda entre los países productores de hidrocarburos y los países demandantes de estos productos se ha visto también incrementada y consecuentemente el tráfico marítimo de hidrocarburos, debido a que es el principal medio de transporte que se utiliza.

El transporte marítimo de hidrocarburos está regulado por diferentes normativas comunitarias y leyes propias de cada país, cuyo objetivo es que se cumplan unos estándares de calidad y de seguridad, con el fin de evitar accidentes marítimos, pero esto no siempre es así. Como se ha comentado en esta introducción, en las últimas décadas ha habido diferentes accidentes marítimos de hidrocarburos que han sido graves catástrofes y han ocasionado daños considerables tanto a los ecosistemas como a la salud de las personas.

Uno de los principales daños ocasionados en la salud de las personas es el asociado a la exposición inhalada de VOCs generada en los derrames

producidos por los accidentes marítimos de tráfico de hidrocarburos. Las consecuencias para la salud de la inhalación de VOCs derivados de fuel, bien sea de manera accidental o por motivos laborales, se han estudiado en diversos escenarios.^{56, 65-71} Entre ellos destaca la exposición por parte de trabajadores en las tareas de limpieza de derrames de fuel que ocasionaron un gran impacto ecológico alcanzando una gran repercusión mediática, debido a la magnitud de las catástrofes.^{72, 73} Las tareas de limpieza de fuel generado por los derrames de las catástrofes mostraron en las personas involucradas en estas labores evidencia de efectos nocivos provocados por la inhalación de VOCs derivados del fuel. Posteriormente a las catástrofes se realizaron diversos estudios de seguimiento sobre los efectos nocivos de la exposición a VOCs en el personal de limpieza, los cuales relataron evidencia de enfermedades en las vías respiratorias superiores, irritación faríngea y conjuntival, cefaleas, mareos, náuseas y vómitos, ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares.^{22, 32} En lo relativo a los efectos sobre el sistema respiratorio, también se notificaron crisis de asma^{71, 74} y un incremento no específico de reactividad bronquial.^{32, 46, 60-62, 73} Asimismo se constató que estos efectos persistían después de finalizar las actividades de limpieza.^{62, 64}

En el año 2002, a raíz del hundimiento del Prestige a unos 250 Km de la costa de Galicia, al noroeste de España, se vertieron al océano atlántico más de 60.000 toneladas de fuel clase 2B con un alto contenido de hidrocarburos aromáticos, que afectaron a unos 1.000 km de costa, no solo en el noroeste y norte de España, sino que también afectó a las costas de Portugal y Francia, lo que provocó unas de las mayores catástrofes medioambientales antes de que ocurriera el derrame en el Golfo de México, de la plataforma petrolera Deepwater Horizon en 2009.⁷¹ Al menos una 300.000 personas participaron en las actividades de limpieza en los meses posteriores al hundimiento del Prestige. Entre ellos se incluyeron trabajadores contratados para las tareas de

limpieza, voluntarios, pescadores, militares y trabajadores pertenecientes a la compañía del fuel vertido, los cuales estuvieron expuestos a la inhalación de los vapores producidos por los VOCs del fuel durante su participación en las actividades de limpieza. Estos sujetos expuestos a la inhalación mostraron síntomas agudos y a corto plazo, entre los que se incluyeron cefaleas, mareos, náuseas, eritema e irritación de la vía respiratoria superior,^{32, 46, 61} así como un daño en el ADN.⁷⁵ Posteriormente, se realizó un gran estudio epidemiológico en las zonas afectadas por la catástrofe que respaldó estos datos, en el cual, los síntomas respiratorios, la función pulmonar y los marcadores inflamatorios de las personas expuestas al fuel fueron analizados. Los datos del estudio revelaron evidencia en el aumento de la frecuencia de los síntomas respiratorios en el tracto superior e inferior,⁵⁸ hiperreactividad bronquial^{60, 73} con apenas diferencia frente a la espirometría basal,⁶² y con concentraciones más altas de los factores de crecimiento vascular VEGF y FGF, así como del marcador de estrés oxidativo 8-isoprostano en condensado de aire exhalado.⁶² Asimismo, dos años después de la exposición a los compuestos orgánicos volátiles del fuel, los datos recogidos sugirieron efectos persistentes en el sistema respiratorio, los cuales permanecían en las vías respiratorias inferiores en una encuesta realizada cinco años después de la exposición.⁶⁴

Los datos de los estudios realizados a raíz de la catástrofe del Prestige sugieren la existencia de un mecanismo patogénico inflamatorio persistente o de un daño en los tejidos pulmonares no resuelto que subyace a las anomalías observadas. Esta hipótesis, unida a las limitaciones de los estudios de campo para ofrecer una visión clara de los mecanismos involucrados en estos hallazgos patológicos, nos condujo a plantear el desarrollo de un modelo experimental, con el objetivo de que los datos obtenidos pudieran proporcionar un conocimiento más profundo sobre los mecanismos patogénicos involucrados y asimismo contribuir a guiar potenciales decisiones diagnósticas

y/o terapéuticas en el manejo clínico de los sujetos afectados por la catástrofe del buque Prestige, u otras situaciones similares que se pudieran producir ulteriormente. Ante la falta de datos previos, el establecimiento del modelo debía pasar por un primer objetivo específico de exploración técnica a fin de establecer la metodología de generación de VOCs similares a los producidos en la catástrofe del Prestige y la exposición experimental a los mismos. La respuesta a esta exposición se valoraría en base a mediciones de reactividad bronquial a metacolina, como variable de desenlace en forma de respuesta fisiológica *in vivo*, habiendo sido ésta una variable guía en los estudios realizados en los sujetos humanos. Esta exploración se realizaría en ratones de cepa C57BL/6, y en ratas de cepas Brown Norway (BN) y Wistar, a fin de seleccionar la especie y cepa mejor respondedora, entre estas opciones que representan tendencias a distintos perfiles de respuesta inmunológica. Los datos de reactividad bronquial a metacolina se complementarían con información obtenida a partir del procesamiento subsiguiente de muestras biológicas de los animales. A estos efectos, se estudiaría si las modificaciones de función pulmonar causadas por la exposición al fuel conllevan una respuesta inflamatoria asociada. Para este propósito se analizarían en lavado broncoalveolar (*bronchoalveolar lavage*, BAL): (a) las concentraciones de citoquinas correspondientes a los perfiles de respuesta inmunitaria tipo Th1 (interleucina (IL)-12, interferón-gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-13); y (b) se llevaría a cabo recuento leucocitario diferencial en preparaciones citocentrifugadas y análisis de subpoblaciones de células T mediante citometría de flujo. En secciones pulmonares con fijación estandarizada y tinciones histológicas e inmunohistoquímicas apropiadas, se examinaría el perfil inflamatorio y su distribución tisular, y se realizaría morfología cuantitativa para medir la carga inflamatoria por tipos celulares específicos, en las vías respiratorias y parénquima pulmonar. Finalmente, con

el objetivo de examinar si la exposición al fuel induce una respuesta reparadora disregulada que origine cambios estructurales patológicos o “remodelación”, se realizarían tinciones inmunohistoquímicas o inmunofluorescentes para la identificación de componentes tisulares específicos, y se mediría su cuantía mediante morfología cuantitativa. En las vías respiratorias se realizarían mediciones normalizadas de la cantidad de células productoras de moco, depósito subepitelial de componentes de la matriz extracelular, y “masa” de músculo liso. En el parénquima se medirían la densidad volumétrica de las paredes alveolares, la densidad de la red microvascular y el depósito de matriz extracelular, con el fin de detectar procesos destructivos o fibrogénicos. Para valorar la actividad biológica remodeladora y sus mecanismos, se medirían marcadores adicionales seleccionados discrecionalmente según los resultados del examen histopatológico de las secciones pulmonares.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El conjunto de hipótesis planteado en este proyecto en función de las premisas expuestas son las siguientes:

1. La exposición repetida a fuel pesado "tipo Prestige" de roedores de laboratorio (ratón/rata) induce enfermedad respiratoria subaguda que persiste tras un lapso de tiempo subsecuente a la exposición.
2. Distintas cepas de ratón y rata pueden presentar diferente sensibilidad a los efectos de la exposición al fuel, dependiendo de su predominancia de respuesta inmunitaria adaptativa tipo T_{helper} (Th)1 o Th2.
3. La enfermedad respiratoria resultante de la exposición engloba alteraciones de la función pulmonar detectables mediante técnica de oscilación forzada bajo ventilación mecánica.
4. Bajo las alteraciones de fisiología respiratoria subyace una respuesta inmunitaria con infiltración inflamatoria pulmonar de perfil crónico (linfocitario/mononuclear).
5. En asociación a la inflamación pulmonar, se desarrollan alteraciones estructurales patológicas (remodelación tisular) que pueden afectar a las vías respiratorias y/o parénquima pulmonar, y pueden incluir alteraciones epiteliales (hiperplasia/hipertrofia de células productoras de moco), fibrosis, y crecimiento de estructuras mesenquimales.

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto fue desarrollar un estudio experimental de patología pulmonar producida por la exposición a fuel tipo “Prestige”, utilizando para ello un modelo animal con la finalidad de explorar los mecanismos de patología pulmonar persistente. Con ello se ha pretendido analizar los mecanismos patogénicos implicados y generar conocimiento que pueda contribuir a guiar potenciales decisiones clínicas en una situación sobre la que existe escasa base de conocimiento.

Los **objetivos específicos** de este proyecto han sido los siguientes:

1. Desarrollo de la instrumentación tecnológica necesaria y establecimiento del modelo animal de exposición inhalada a VOCs generados por fuel tipo “Prestige”, con análisis de dinámica de resolución o persistencia de efectos tras ventana de aclarado.
2. Estudio de la respuesta de función pulmonar en cepas de rata y ratón, a nivel inmediato y tardío, tras un periodo de exposición a VOCs generados por fuel tipo "Prestige".
3. Análisis de la respuesta inmunitaria pulmonar y perfil inflamatorio.
4. Análisis de la remodelación patológica de estructuras pulmonares.

MÉTODOS

1. Aspectos normativos

El protocolo del estudio y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Xunta de Galicia, en cumplimiento con la Directiva de la Unión Europea 86/609 y el Real Decreto 1201/2005. El manejo de los animales, los procedimientos experimentales y la producción de datos y su análisis fueron llevados a cabo en cumplimiento con las Guías *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments* (ARRIVE).⁷⁶

2. Animales

Se emplearon ratas de las cepas consanguíneas Wistar y Brown Norway de 150-180 g de peso, y ratones hembra de cepa C57BL de 18-23 g de peso. Los animales fueron adquiridos de Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, España) y alojados en un estabulario acreditado en el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC). Los animales fueron mantenidos en cubetas de policarbonato (2-3 ratas o 4-5 ratones por cubeta de acuerdo a las normas vigentes), emplazadas en un *rack* ventilado dotado de sistema de filtración de partículas en aire de alta eficiencia (filtro *High-Efficiency Particulate Arrestance*, HEPA), y bajo condiciones controladas de temperatura (21-24°C), humedad (40-55%) y ciclo de luz/oscuridad (12/12 horas), con acceso *ad libitum* a comida (Harlan Interfauna Ibérica) y agua. Cada lote de animales permaneció sin manipulaciones experimentales durante un periodo de adaptación de 7 días tras su entrega por el proveedor.

3. Diseño del estudio

El estudio fue diseñado con la finalidad de obtener una representación estimada de la secuencia de hechos que acaecieron en el caso de la exposición humana donde, tras la exposición inhalatoria al vertido de petróleo durante las tareas de limpieza de costas, el estudio clínico-epidemiológico fue realizado al cabo de un lapso de tiempo. El diseño del estudio se representa en el diagrama de la Fig. 10, y fue idéntico para cada cepa de rata o ratón.

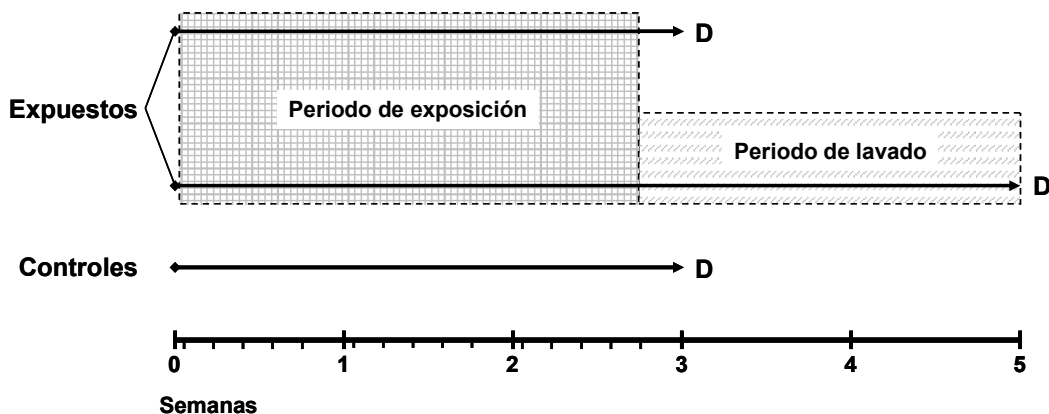


Figura 10. Diseño del estudio para cada cepa y/o especie analizada. "D": punto de corte de obtención de datos. Respectivos grupos paralelos de animales expuestos se analizaron en un punto de corte temprano al finalizar la exposición, y en un punto de corte tardío tras un periodo de 2 semanas libres de exposición (periodo de lavado). Los animales control no expuestos constituyeron un grupo único de referencia para los dos grupos de animales expuestos, en cumplimiento con el principio "3R" (Reducir, Reusar, Reciclar) de las guías de utilización y manejo de animales de experimentación.

Los animales fueron expuestos a componentes orgánicos volátiles vaporizados generados a partir de fuel de características equivalentes a las del vertido por el buque *Prestige*, mediante el material, equipo y procedimientos especificados en las secciones subsiguientes. En cada subestudio (especie/cepa), los animales se asignaron mediante aleatorización consecutiva a respectivos grupos de expuestos y grupo control paralelo de no expuestos. Los grupos expuestos recibieron administración inhalada de componentes orgánicos volátiles durante sesiones de 2 horas, 5 días a la semana en régimen de lunes a viernes, con una duración total de la exposición de 3 semanas. Estos grupos se dividieron en subgrupos (denominados "grupos" a partir de este punto a efectos de análisis y presentación de datos), con la finalidad de realizar los procedimientos de generación de datos en dos puntos diferentes de tiempo: (a) un punto de corte temprano con la exposición recién finalizada (el lunes siguiente al viernes de la última exposición); y (b) un punto de corte distante, a las 2 semanas tras la finalización de la exposición, para el que sirvieron de comparadores los animales control no expuestos y los datos del punto de corte temprano. El tamaño muestral de todos los grupos fue de $n=6$.

4. Fuel de exposición y especificaciones técnicas

Para los experimentos de este estudio se desestimó el empleo de restos conservados del vertido original del buque *Prestige* al considerarse que, debido a procesos degradativos durante el tiempo transcurrido, no serían representativos de las propiedades del material nativo vertido en la catástrofe. La compañía Repsol S.A. (Repsol-YPF en el momento del estudio), mediante un acuerdo de colaboración y disponiendo de todos los datos analíticos necesarios sobre el vertido del buque *Prestige* tras haber evacuado

preventivamente los restos de fuel atrapados en el pecio hundido, sintetizó para este proyecto un fuel representativo del vertido, en la refinería experimental de su centro de Investigación y Desarrollo (Centro de Tecnología Repsol, Móstoles, Madrid). El fuel vertido por el buque *Prestige* correspondía en las clasificaciones de normalización al Número 6 de la *American Society for Testing and Materials* (ASTM), o Número 2 de la *Association Française de Normalisation* (AFNOR). Las características físico-químicas del fuel sintetizado por Repsol S.A. para el presente estudio se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones técnicas del fuel "tipo *Prestige*" sintetizado por Repsol S.A.

Parameter	Value	Units	ASTM standard	UNE-EN/ISO standard
Density at 15°C	991	Kg/m ³	D 1298	ISO 3675
Color	Black	--	--	--
Kinematic viscosity at 50°C	380	cSt	D 445	ISO 3104
Flash point	60	°C	D 93	ISO 2719
Pour point	30	°C	--	ISO 3016
Carbonous residue	18	%, mass/mass	D 189/D 4530	ISO 10370/ ISO 6615
Ashes	0.15	%, mass/mass	D 482	ISO 6245
Water	0.5	%, volume/volume	D 95	ISO 3733
Sulfur	4.5	%, mass/mass	--	ISO 8754
Vanadium	300	mg/Kg	D 1548	
Aluminum + silicium	80	mg/Kg	IP 470/ IP 501	ISO 10478
Total sediment	0.1	%, mass/mass		ISO 10307-2
Zinc	15	mg/Kg	IP 470/ IP 501	--
Phosphorus	15	mg/Kg	IP 501 / IP 500	--
Calcium	30	mg/Kg	IP 470/ IP 501	--

Fuente: Repsol S.A. Datos proporcionados para el estudio.

5. Sistema de exposición

Los animales fueron expuestos a los VOCs del fuel mediante una torre de exposición de flujo vertical, diseñada para estudios de farmacología y toxicología inhalatoria en roedores de laboratorio (Electro-Medical Measurement Systems EMMS, London, UK). El equipo garantiza la exposición controlada y homogénea en todos sus puertos de conexión. Dicho equipo fue adaptado para las necesidades específicas de este proyecto, mediante colaboración con el Departamento de Ingeniería de su fabricante, EMMS, en consultoría con la *British Toxicology Society* (BTS). El diseño del equipo se representa en las Figs. 11 y 12. Las partes básicas del equipo son: (a) un sistema de vaporización diseñado específicamente para la liberación y conducción de los VOCs generados a partir del fuel proporcionado por Repsol S.A.; (b) la torre de exposición; (c) los conos de exposición nasal que alojan a los animales y se acoplan a los puertos de la torre; (d) un sistema de generación de flujos con presión diferencial regulada a través de la torre de exposición; y (e) una vía de salida de flujos dotada de un sistema de descontaminación previa a la liberación de los mismos en el interior de una campana homologada de presión negativa para extracción de volátiles tóxicos, en cuyo interior se alojó el equipo completo y se realizaron las operaciones de exposición. La cámara de exposición, diseñada y fabricada *ad hoc* por EMMS, consistió en una ampolla de vidrio con dos compartimentos separados por una lámina microporosa permeable al aire. El fuel se inyecta gradualmente en la cámara superior formando una película sobre la lámina microporosa, y el aire se bombea a través de la misma desde el compartimento inferior hacia el superior, desde el cual es conducido a la torre de exposición. La torre de exposición se alimenta con un flujo constante del aire que pasa previamente por la cámara de vaporización.

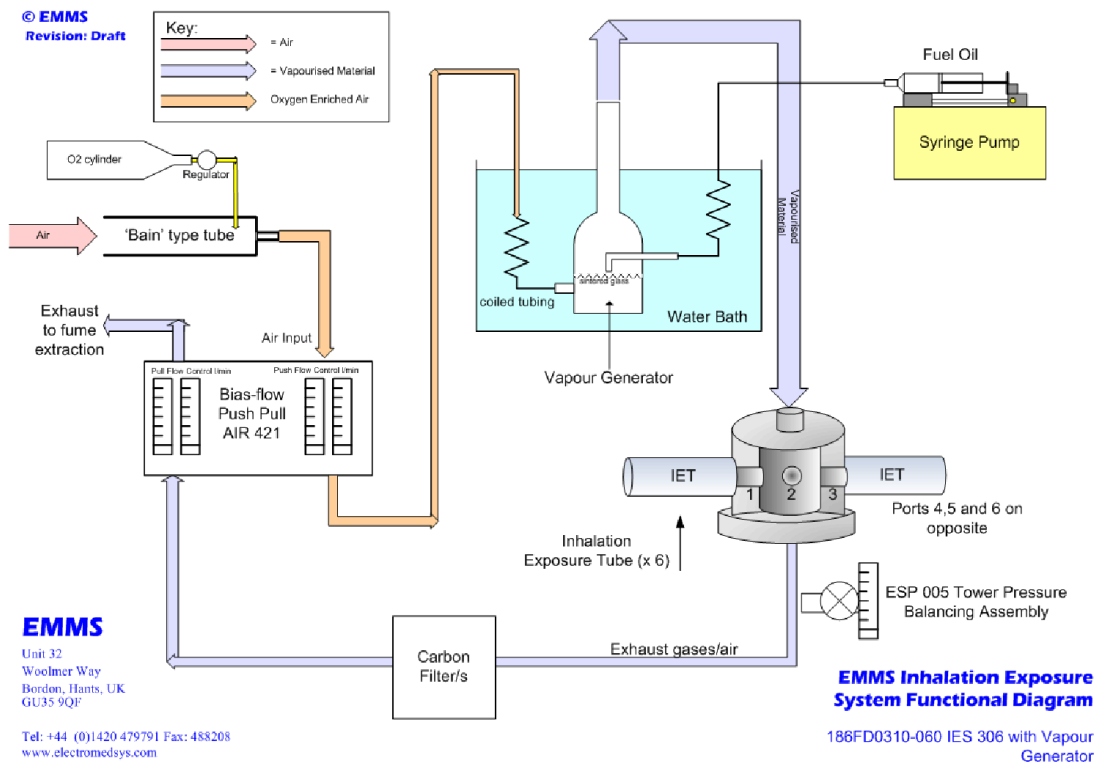


Figura 11. Diagrama del equipo de exposición a VOCs diseñado y fabricado por *Electro-Medical Measurement Systems* (EMMS) en consultoría con la *British Toxicology Society* para el presente estudio. La circulación de aire a través del circuito es generada por una bomba doble (Bias-flow Push Pull AIR 421), de propulsión en la entrada al sistema y succión en su salida. El balance de presión diferencial entre la entrada y la salida está equilibrado electrónicamente mediante el componente ESP 005 Tower Pressure Balancing Assembly, con la finalidad de que en los puertos de inhalación de los animales (Inhalation Exposure Tube, IET) de la torre de exposición, no se generen presiones positivas o negativas que afecten a la respiración tidal espontánea de los animales conectados (más detalles en el texto). En la cámara de vaporización (Vapour Generator) se inyecta el fuel (Fuel Oil Syringe Pump) sobre una lámina de vidrio poroso atravesada por el flujo de aire en sentido ascendente. El aire con VOCs es conducido a la torre de exposición, que en su interior dispone de una estructura de recirculación en cámaras concéntricas para homogeneizar el reparto a los puertos de exposición de los animales. El aire de salida pasa por un módulo de descontaminación mediante filtros de carbono activado y gel de sílice, antes de ser liberado en el interior de una campana de extracción de volátiles tóxicos. Fuente: EMMS, proporcionado para este estudio.

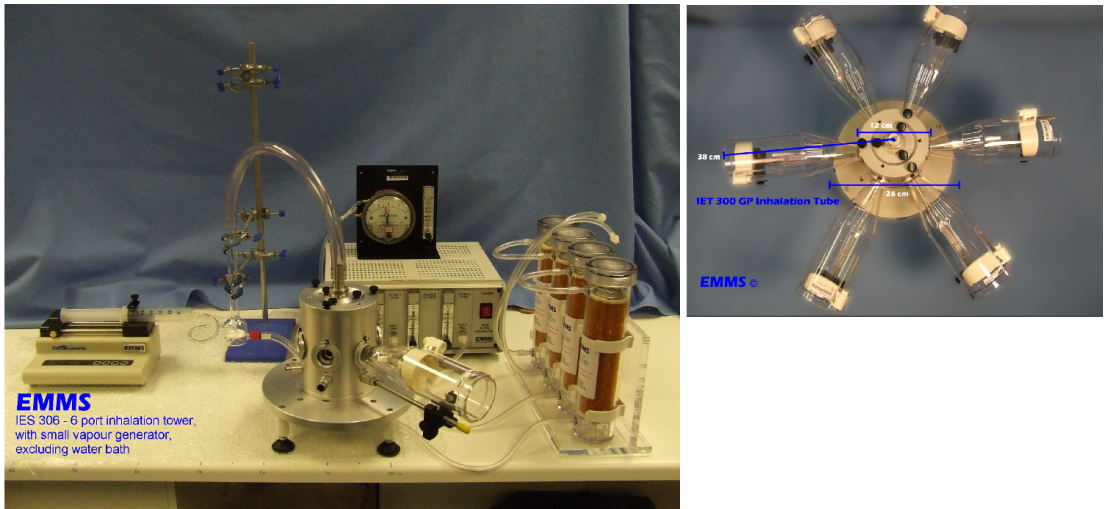


Figura 12. Equipo de exposición a VOCs en presentación previa a su entrega por el fabricante. En la fotografía izquierda se muestran, de izquierda a derecha: la jeringa motorizada para inyección de fuel; la cámara de vaporización; la torre de exposición con un ejemplo de tubo de final cónico de exposición nasal acoplado a uno de los puertos de inhalación; el módulo de bomba dual de propulsión-succión (detrás); el controlador de presión diferencial del sistema (encima); y el módulo de descontaminación (derecha). En la fotografía de la derecha se muestra una visión ortogonal de la torre de exposición, con tubos de alojamiento de animales acoplados a los seis puertos de inhalación (sistema para la exposición simultánea de seis animales en cada sesión). Los tubos de exposición están diseñados para inhalación nasal sin depósito de VOCs sobre la superficie corporal del animal. Ello evita asimismo la exposición digestiva al auto-asearse los roedores mediante su lengua una vez liberados en sus habitáculos de mantenimiento en el estabulario. Fuente: EMMS.

En determinaciones previas a la utilización del sistema en condiciones reales, se verificó que no existía depleción de oxígeno en el aire suministrado a la torre de exposición tras su paso por la cámara de vaporización, por lo cual no existió la necesidad de suplementar con oxígeno la mezcla de aire. Durante cada sesión de exposición de 2 horas, se inyectaron 2 mL del fuel sintetizado por Repsol S.A. en la cámara de vaporización mediante una jeringa accionada lentamente por un compresor electrónico regulable. La cámara de vaporización se encontraba sumergida en un baño de agua a 60°C para facilitar el flujo del fuel por los tubos del equipo, debido a su alta viscosidad. Esta maniobra no afectaba a la temperatura del aire suministrado a la torre de exposición, en la cual entraba a temperatura ambiente, ni a la composición de los VOCs liberados (ver sección siguiente sobre verificación de composición de VOCs en el aire muestreado en los puertos de inhalación). El flujo de aire se mantenía constante a través del circuito mediante un sistema de dos bombas de presión positiva y negativa respectivamente, con balance de presión diferencial regulado electrónicamente entre ambas. En los puertos de conexión de los conos de exposición nasal de los animales, se generaba una presión ligeramente negativa respecto a la presión atmosférica exterior, para garantizar la respiración espontánea de los animales sin generar inspiración o insuflación forzada. En la vía de salida, el aire pasaba a través del sistema de descontaminación, dotado de parejas de filtros en serie de carbón activado y gel de sílice desecante, antes de ser liberado en la campana de extracción.

6. Verificación de composición de VOCs en el aire inhalado

La composición de VOCs en el aire inhalado por los animales se verificó mediante espectrometría de gases, a través de la asesoría y prestación de este servicio por los *Servizos de Asistencia á Investigación (SAI)* de la *Universidad*

da Coruña. Se llevó a cabo un análisis estándar de contenido BTEX (benceno, tolueno, etil-benceno y xilenos) en la totalidad del aire suministrado en una sesión de exposición completa de 2 horas. Para esta finalidad, se muestreó el aire en los puertos de acoplamiento de los conos de inhalación nasal mediante tubos de desorción térmica (Perkin-Elmer Thermal Desorption Tubes, Sigma-Aldrich), acoplados a una bomba de muestreo de aire a flujo constante de 60.08 mL/minuto durante las 2 horas. Las muestras fueron posteriormente sometidas a elución por desorción térmica en columnas capilares SGE-BPX (Grace, U.S.A.) mediante un equipo Perkin-Elmer Turbomatrix, y analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de gases Thermo Finnigan PolarisQ de trampa iónica (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, U.S.A.). Los resultados del análisis de compuestos BTEX se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Verificación analítica de VOCs en los puertos de exposición.

Time (min)	Benzene (µg)	Toluene (µg)	Ethylbenzene (µg)	m+p-xylene (µg)	o-xylene (µg)
0-30	17,2	1122	344	643	661
30-60	12,4	503	31,3	64	53
60-90	12,4	602	24,3	51,7	38,8
90-120	7,9	448	6,9	10,6	6,4
Total (µg)	49,9	2675	406,5	769,3	759,2
Animal (mg/m³)	24,98	1339,28	203,52	385,16	380,11

Se muestreó y sometió a análisis de BTEX mediante espectrometría de gases el aire correspondiente al suministro a un animal durante una sesión de inhalación. La tabla muestra las mediciones correspondientes a los intervalos de tiempo indicados, y la concentración global en el aire inhalado por el animal por m³ de aire. Los datos mostrados son el promedio de tres mediciones. Fuente: *Servizos de Asistencia á Investigación (SAI), Universidade da Coruña*.

Los VOCs derivados del fuel alcanzaron su máximo nivel en los 30 primeros minutos de la exposición, con un posterior declive paulatino hasta las 2 horas. La composición de los vapores resultó comparable a la resultante de las mediciones de campo realizadas por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Ministerio de Ciencia y Educación, Gobierno de España) sobre los vertidos de la catástrofe durante las tareas de limpieza,³¹ aunque no exactamente idéntica teniendo en cuenta la variabilidad de condiciones del vertido nativo a lo largo del tiempo transcurrido durante la flotación y su depósito en las costas. Durante los primeros días tras la catástrofe, el fuel vaporizado produjo las concentraciones más elevadas de compuestos BTEX y causó los síntomas agudos más intensos en los voluntarios de las tareas de limpieza. La vaporización del fuel sintetizado por Repsol S.A. para este proyecto produjo niveles de tolueno más elevados que los medidos en las costas afectadas por el vertido del buque Prestige, pudiendo posiblemente reflejar de forma más cercana las características del fuel recién vertido en alta mar.

7. Mediciones *in vivo* de hiperreactividad de vías respiratorias

Para estudiar el efecto de la inhalación de los VOCs procedentes del fuel vaporizado sobre la función respiratoria, se midió la reactividad de vías respiratorias a metacolina a los tres días de la última sesión de exposición, o tras un lapso de 2 semanas. Para esta finalidad, los animales fueron anestesiados con sevoflurano inhalado al 4% (Sevorane®, Abbott Laboratories, Illinois, USA) mediante un vaporizador convencional de equipo de anestesia humana (Abbott), emplazando los animales en una cámara de plexiglás para la inhalación del anestésico. Una vez verificado el estado de anestesia profunda mediante comprobación de la abolición de los reflejos plantares y corneales, se

procedió a la realización de traqueostomía e intubación mediante una cánula traqueal diseñada para rata o ratón (EMMS) según correspondiese, seguido de fijación firme de la cánula con seda quirúrgica. Seguidamente, se procedió a inducir bloqueo neuromuscular mediante la administración de 1 mg/kg de bromuro de rocuronio (Organon Pharmaceuticals, New Jersey, U.S.A.) vía inyección intraperitoneal (*i.p.*), y los animales fueron conectados inmediatamente a un equipo FlexiVent (Scireq, Montreal, Canadá) de medición de función pulmonar bajo ventilación mecánica, acoplándose al ventilador el suministro continuado del anestésico vaporizado. En caso de detectarse interferencia con el ventilador de movimientos de respiración espontánea (“lucha”) durante el procedimiento, se administraron dosis adicionales de bromuro de rocuronio. Los animales fueron ventilados en modo de mantenimiento con frecuencia respiratoria de 250 min⁻¹ y volumen tidal de 0.14 mL con presión positiva teleespiratoria (*positive end expiratory pressure*, PEEP) de 2 cmH₂O para los ratones, y frecuencia respiratoria de 90 min⁻¹ con volumen tidal de 1.5 mL y PEEP de 3 cmH₂O para las ratas, respectivamente. Para la realización de mediciones de resistencia pulmonar (*lung resistance*, R_L) se interrumpió la ventilación mecánica de mantenimiento y se indujeron perturbaciones de presión mediante técnica de oscilación forzada (*forced oscillation technique*, FOT) bajo modelo lineal de primer orden de compartimento único, mediante el cual se derivaron de la impedancia total la R_L, *compliance* y coeficiente de determinación de ajuste del modelo. Tras su conexión, los animales fueron estabilizados durante 5 minutos bajo ventilación de mantenimiento. Seguidamente, se realizaron mediciones de parámetros de línea de base de función pulmonar durante 5 minutos. A continuación, se inició el protocolo de broncoprovocación con concentraciones crecientes de metacolina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.), administradas mediante un nebulizador ultrasónico (Aeroneb®, Buxco Research Systems,

San Francisco, U.S.A.) acoplado a la rama inspiratoria del ventilador. La escala de dosis administradas de metacolina se muestra en la Tabla 5. Cada nebulización fue seguida de maniobras FOT durante 4 minutos para captar el pico de R_L , y los datos se exportaron a tablas de Microsoft Excel para su organización y posterior análisis.

Tabla 5. Escala de concentraciones de metacolina (mg/mL)

Dosis	Ratón	Rata
D0	PBS	PBS
D1	1,25	1,56
D2	2,5	3,125
D3	5	6,25
D4	10	12,5
D5	20	25

8. Recolección y procesamiento de muestras biológicas

8.1. Lavado broncoalveolar (BAL)

Tras la finalización de las mediciones de función pulmonar, se realizó eutanasia de los animales mediante incremento al 5% del sevoflurano inhalado y la administración *i.v.* de 0.2 mL de heparina sódica al 1% y 0.3 mL de cloruro potásico al 7.45%. Inmediatamente, se recogió BAL a través de la cánula intratraqueal mediante la instilación y recogida de 5 mL de suero salino en fracciones de 1 mL en el caso de los ratones, o 25 mL en fracciones de 5 mL en el caso de las ratas. La fracción celular del BAL fue separada y resuspendida, marcada con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y CD8 conjugados con fluorocromos (Santa Cruz Biotechnologies Inc., Texas, U.S.A.), y analizada mediante citometría de flujo con un equipo FACScalibur (BD

Biosciences, Madrid). El fluido sobrenadante de cada primera fracción de BAL se congeló en alícuotas a -80°C y se analizó posteriormente para determinar la concentración de los mediadores IL-1 α , MCP-1, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF e IL-4 mediante un sistema calibrado *multiplex* de micropartículas marcadas con fluorocromos para citometría de flujo (FlowCytomix™, eBioscience, San Diego, USA).

8.2. Disección y procesamiento pulmonar

Tras la recolección de BAL, se realizó una incisión abdominal anterior con punción del diafragma mediante acceso inferior y sección del paquete vascular cava-aorta a nivel abdominal. Seguidamente, con los pulmones parcialmente colapsados, se abrió el tórax vía incisión media anterior y se realizó punción del ventrículo cardíaco derecho para proceder a un lavado del circuito vascular pulmonar mediante la infusión de suero salino tamponado con fosfatos (*phosphate-buffered saline*, PBS). La finalidad de este lavado vascular es la eliminación de la sangre y con ello de los leucocitos circulantes en los pulmones, para facilitar la precisión en la posterior evaluación de los infiltrados inflamatorios tisulares por leucocitos activados y extravasados. Seguidamente, se extrajo mediante disección el bloque cardiopulmonar incluyendo la tráquea canulada y se conectó mediante la cánula a un sistema de recirculación de formalina al 10% con la finalidad de fijar los pulmones a una presión estandarizada de 25 cmH₂O durante 24 horas. Mediante este sistema de instilación vía traqueal de formalina a presión estandarizada, los pulmones quedan fijados a capacidad pulmonar total y no se colapsan al desconectarlos del sistema y seccionarlos, lo cual permite la posterior realización de mediciones de estructuras pulmonares mediante morfología cuantitativa. A las 24 horas de fijación, los pulmones se escindieron y se seccionaron

sagitalmente en respectivas porciones lateral e hilar, las cuales se introdujeron en *cassettes* de histopatología y se procesaron durante la noche siguiente (mediante procesador de tejidos automático; Leica Biosystems, Barcelona) con la finalidad de embeber los tejidos en bloques de parafina para su posterior sección en microtomo. De los bloques de tejido se obtuvieron secciones de 5 μm de grosor montadas sobre cristales portaobjetos adherentes (SuperFrost[®] Plus, Fisher Scientific, Madrid). Las secciones pulmonares se tiñeron con: (a) hematoxilina-eosina para evaluación histopatológica general; (b) tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) para el recuento de células caliciformes productoras de moco y carga mucoide en el epitelio de las vías respiratorias; y (c) tricrómico de Masson para evaluar el depósito de matriz extracelular y determinar la fibrosis subepitelial.

9. Morfología cuantitativa del parénquima pulmonar

En las secciones pulmonares teñidas con hematoxilina-eosina se realizaron mediciones de densidad volumétrica (V_V) del parénquima pulmonar para determinar cuantitativamente la presencia de enfisema. Para ello se empleó el programa de análisis cuantitativo de imagen digital ImageJ v1.47 (National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A., disponible en <http://imagej.nih.gov/ij/>). Por cada animal, al menos 15 imágenes de parénquima pulmonar en región subpleural se capturaron, con un objetivo acromático 20x, empleando un microscopio Olympus BX61/BX62 de campo claro con cámara digital Olympus DP70 (Olympus Corporation, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona), y se analizaron con ImageJ. Para doble verificación, se realizaron las mediciones mediante dos métodos:

9.1. Extracción digital de paredes alveolares

Utilizando las herramientas de procesamiento de imagen de ImageJ, las imágenes fueron convertidas a codificación binaria (blanco/negro) mediante un umbral de separación nítida entre tejido y espacios aéreos. Seguidamente, se procedió a la extracción digital del tejido de las paredes alveolares y a la medición de su superficie de corte, que fue normalizada por la superficie total de la imagen obteniéndose así un índice adimensional de densidad volumétrica de tejido en el parénquima pulmonar.

9.2. Método de *Mean Linear Intercept* (L_m)

El método L_m es un procedimiento para cuantificar la presencia de una estructura aleatoriamente distribuida en un campo de microscopía, ampliamente utilizado antes de la existencia del tratamiento informatizado de imagen digital, para la medición de los espacios aéreos y las paredes alveolares en el parénquima pulmonar.⁷⁷ El principio básico consiste en utilizar como sonda de muestreo una línea de longitud definida superpuesta al campo de la imagen (en forma de línea única o como parrilla de una serie de líneas rectas o sinusoides), y contabilizar los puntos de corte de la línea con la estructura bajo medición. Cuanto más elevada sea la frecuencia de puntos de corte normalizados por la longitud total de la línea sonda, más elevada es la densidad de superficie de la estructura en el plano de corte, y concordantemente su densidad volumétrica.^{78, 79} En el caso de la presente aplicación, se superpuso a las imágenes una parrilla con 6 líneas horizontales y 8 líneas verticales equidistantemente distribuidas, y se contaron las intersecciones con paredes alveolares (Fig. 13), calculándose a continuación el índice L_m de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$L_m = \frac{V \times LV + H \times LH}{Ni}$$

donde V es el número de líneas verticales; LV es la longitud de cada línea vertical; H es el número de líneas horizontales; LH es la longitud de cada línea horizontal; y Ni es la suma de todas las intersecciones. El índice L_m se comporta con proporcionalidad inversa, es decir, cuanto mayor sea su valor, más baja es la densidad volumétrica del parénquima pulmonar. En el enfisema pulmonar, por tanto, el valor del índice L_m aumenta.

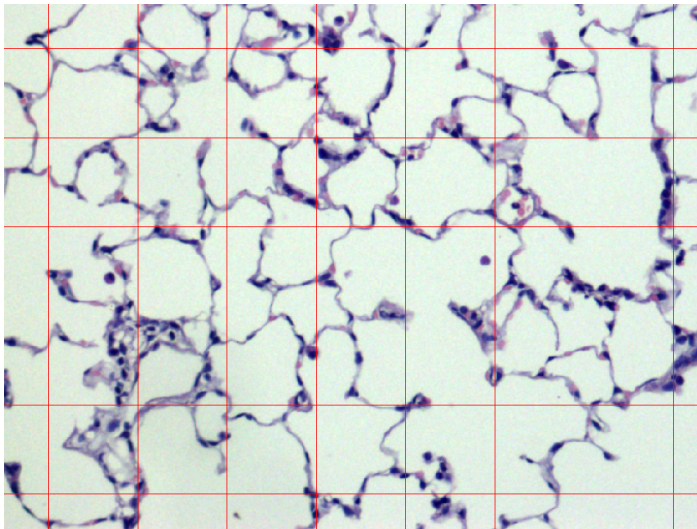


Figura 13. Gradilla para el cálculo de cantidad de tejido parénquima pulmonar en volumen según el clásico índice L_m . La imagen se somete a calibración de tamaño real mediante una regla microscópica de referencia. Conocida la longitud total del trazado lineal de la gradilla superpuesta, se cuentan las intersecciones de línea con paredes alveolares en cada campo muestreado y se calcula el índice L_m .

10. Detección y morfología cuantitativa de células apoptóticas

Se llevó a cabo detección de células en apoptosis en las secciones de tejido pulmonar mediante la técnica de *terminal transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) utilizando un kit Apoptag® (Millipore, Madrid, Spain) según el protocolo mostrado en el Anexo 1. Para este procedimiento, con la finalidad de calcular la densidad numérica en volumen (N_V) de células apoptóticas, se emplearon secciones de tejido de 20 μm de grosor. Los núcleos positivos correspondientes a neumocitos tipo I de las paredes alveolares se contaron en 10 campos microscópicos aleatorios por muestra y se normalizaron por mm^3 de sección muestral según procedimiento estereológico.⁸⁰ Para la corrección numérica de células seccionadas en los planos de corte, se eliminaron del recuento las células cuyos núcleos se situaron en el plano focal profundo de la sección (plano del portaobjetos). Los recuentos se realizaron en campos capturados con un objetivo acromático de 40x, cuya calibración resultó en una superficie de campo de 152053.08 μm^2 , correspondiente en la sección de 20 μm de grosor a un volumen muestral de 3041061.69 μm^3 . Los datos se expresaron en células apoptóticas/ mm^3 .

11. Análisis de datos

Para el análisis estadístico de los datos y la generación de gráficos se emplearon los programas SPSS versión 16.0 y SigmaPlot versión 2000, respectivamente. Las distribuciones de datos se presentan como media y error estándar de la media (*standard error of the mean*, SEM). Las comparaciones entre dos distribuciones (grupo expuesto versus grupo control en cada especie) se evaluaron mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Donde corresponde, las comparaciones múltiples entre más de dos

distribuciones se evaluaron mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguida de las pruebas post-hoc de comparaciones múltiples de la diferencia mínima significativa de Fisher (*least significant difference*, LSD), o la prueba de Games-Howell para varianzas desiguales según potencia estadística. Para el análisis de las curvas de reactividad bronquial, las comparaciones intra-grupo se efectuaron mediante ANOVA seguida de la prueba post-ANOVA de Dunnett de comparaciones múltiples frente a control de línea de base, y para las comparaciones inter-grupo se aplicó ANOVA seguido de las pruebas post-ANOVA LSD o Games-Howell según idoneidad. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con un grado de significación $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. La exposición a VOCs del fuel induce hiperreactividad de vías respiratorias frente a broncoprovocación con metacolina en ratas, sin declive en el punto de corte tardío

Las ratas de cepa Wistar mostraron hiperreactividad de vías respiratorias frente a metacolina (incremento de R_L con $P < 0,05$ sobre el grupo control en las dosis de 12,5 y 25 mg/mL) al finalizar una exposición a VOCs de tres semanas (punto de corte temprano; Fig. 1A). Para evaluar la reversibilidad de estos hallazgos, un nuevo grupo de ratas Wistar fue analizado tras la misma exposición de los animales a VOCs durante tres semanas, seguido de un periodo de lavado (no exposición) de dos semanas (punto de corte tardío). La hiperreactividad de vías respiratorias persistió en estos animales después de este periodo de ausencia de exposición ($P < 0,05$ versus grupo control en las dosis 12,5 y 25 mg/mL de metacolina), mostrando un comportamiento de función pulmonar similar al punto de corte temprano (Fig. 1A y Tabla 6). Los tres grupos experimentales (control, ratas expuestas en corte temprano y ratas expuestas en corte tardío) se llevaron a cabo con ratas Brown Norway. En esta cepa, con desviación inmunitaria constitutiva Th2 frente a la desviación Th1 de las ratas Wistar, ambos grupos expuestos mostraron asimismo, en los grupos de corte temprano y tardío, hiperreactividad de vías respiratorias frente a metacolina en las dos dosis más altas, en comparación con el grupo control no expuesto (Fig. 1B y Tabla 6). Por el contrario, no se encontraron cambios en los parámetros de función pulmonar en los ratones C57/BL6 sometidos al mismo diseño experimental (Fig. 1C y Tabla 6).

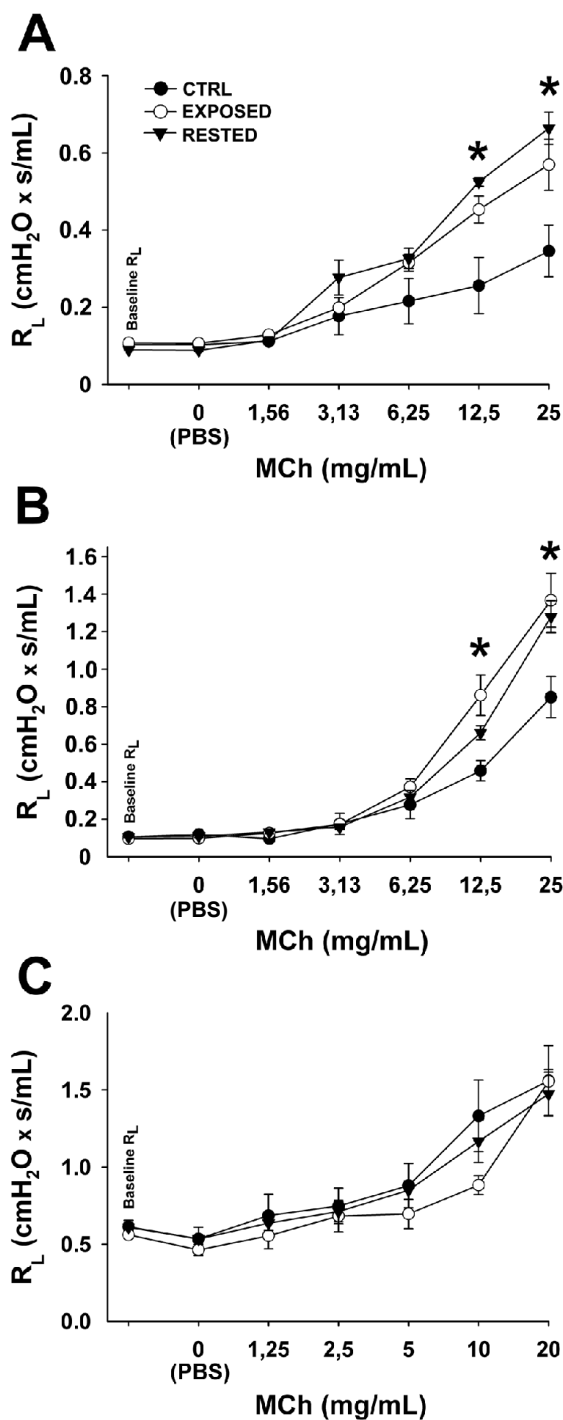


Figura 14. Reactividad de vías respiratorias frente a broncoprovocación inespecífica con metacolina. **(A)** Cepa de rata Wistar. **(B)** Cepa de rata Brown Norway. **(C)** Cepa de ratón C57/BL6. "CTRL": grupo control de animales no expuestos. "EXPOSED": grupo de animales expuestos, punto de corte temprano. "RESTED": grupo de animales expuestos, punto de corte tardío. La leyenda de símbolos en el panel (A) es aplicable a los tres paneles. En ambas cepas de rata, los animales expuestos a inhalación de VOCs mostraron hiper-reactividad de vías respiratorias mantenida al cabo de un lapso de tiempo tras la finalización de la exposición. La cepa C57/BL6 de ratón no mostró respuesta en comparación con los animales control no expuestos. *: $P < 0.05$, animales expuestos *versus* grupo control en las dosis de metacolina indicadas. R_L : Resistencia pulmonar. PBS: *phos-phate-buffered saline* (vehículo). MCh: metacolina. La terminología de grupos *CTRL*, *EXPOSED*, *RESTED* es aplicable a las sucesivas tablas y figuras.

Tabla 6. Datos de reactividad de vías respiratorias (R_L)

Strain	Group	Baseline	D0	D1	D2	D3	D4	D5
Wistar	Control	0.10 ± 0.005	0.10 ± 0.004	0.11 ± 0.008	0.18 ± 0.048	0.22 ± 0.059	0.26 ± 0.073	0.35 ± 0.067
	Exposed	0.11 ± 0.001	0.11 ± 0.002	0.13 ± 0.005	0.20 ± 0.001	0.32 ± 0.022	0.45 ± 0.035	0.57 ± 0.066
	Rested	0.09 ± 0.002	0.09 ± 0.003	0.11 ± 0.009	0.28 ± 0.045	0.33 ± 0.026	0.52 ± 0.011	0.66 ± 0.042
BN	Control	0.11 ± 0.006	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.004	0.18 ± 0.057	0.28 ± 0.073	0.46 ± 0.054	0.85 ± 0.11
	Exposed	0.10 ± 0.004	0.10 ± 0.007	0.13 ± 0.014	0.17 ± 0.013	0.37 ± 0.043	0.86 ± 0.108	1.37 ± 0.144
	Rested	0.11 ± 0.004	0.11 ± 0.008	0.13 ± 0.009	0.16 ± 0.013	0.32 ± 0.035	0.66 ± 0.038	1.28 ± 0.085
C57BL	Control	0.61 ± 0.05	0.53 ± 0.08	0.69 ± 0.10	0.80 ± 0.10	0.96 ± 0.11	1.45 ± 0.18	1.71 ± 0.13
	Exposed	0.55 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.56 ± 0.08	0.68 ± 0.10	0.70 ± 0.10	0.88 ± 0.07	1.56 ± 0.08
	Rested	0.62 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.64 ± 0.05	0.71 ± 0.07	0.85 ± 0.07	1.17 ± 0.15	1.47 ± 0.16

Leyenda Tabla 6. Los datos representan media \pm error estándar de la media (SEM) de resistencia pulmonar (R_L). D0 a D5: dosis respectivas de metacolina para cada cepa y especie. BN: rata Brown Norway. Los valores de P mostrados corresponden a las comparaciones múltiples pos-ANOVA realizadas mediante test de Dunnet para las comparaciones intragrupo *versus* línea de base de R_L , o mediante test de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher o test de Games-Howell para varianzas dishomogéneas según corresponda, para las comparaciones inter-grupo de R_L en cada dosis de metacolina. *: comparación *versus* R_L basal intra-grupo. **: comparación inter-grupo *versus* animales control no expuestos.

2. No se encontraron cambios inflamatorios en el BAL de los animales expuestos a VOCs del fuel, ni signos histopatológicos de inflamación o remodelación de vías respiratorias en secciones pulmonares

Se analizaron recuentos leucocitarios totales y diferenciales en BAL de las tres cepas de roedores. Los animales expuestos no mostraron diferencias en los recuentos celulares totales en comparación con los animales control (Fig. 15 y Tabla 7). Las ratas Brown Norway mostraron una tendencia a un aumento de las células totales en BAL tras la inhalación de VOCs, pero sin significación estadística en el punto de corte temprano ($P=0,22$) ni tardío ($P=0,09$) tras la exposición, en comparación con los animales control no expuestos. Esta tendencia numérica en BAL de las ratas Brown Norway no se reflejó en el examen histopatológico de las secciones pulmonares, en el que no se encontró infiltración inflamatoria de las vías respiratorias en ninguna de las cepas (Fig. 16). El análisis de BAL mediante citometría de flujo no mostró diferencias en el ratio celular $CD4^+ : CD8^+$ entre ninguno de los grupos experimentales, en ninguna cepa. Adicionalmente, el análisis de citoquinas en el sobrenadante del BAL no mostró diferencias significativas entre controles y animales expuestos, en ninguno de los puntos de corte (Fig. 17). Estos resultados concuerdan con

el examen histopatológico de las vías respiratorias en secciones pulmonares, donde no se observaron infiltrados inflamatorios ni cambios estructurales sugerentes de remodelación de vías respiratorias en la evaluación del músculo liso (tinción hematoxilina-eosina), masa mucosa epitelial (tinción PAS) o depósito de matriz extracelular (tinción tricrómico de Masson) (Figs. 16 y 18).

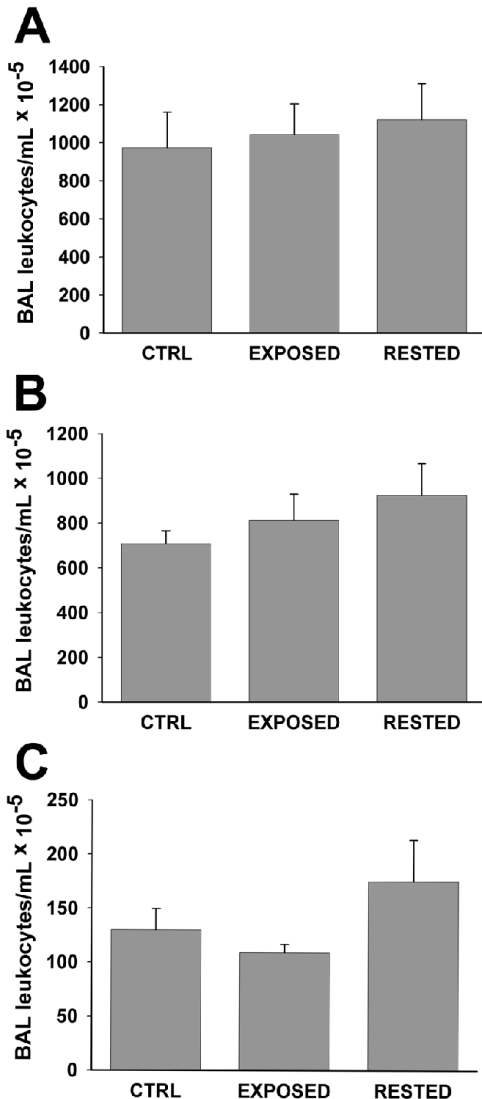


Figura 15. Recuentos leucocitarios totales en lavado broncoalveolar (BAL). **(A)** Ratas Wistar. **(B)** Ratas Brown Norway. **(C)** Ratones C57/BL6. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las cepas analizadas.

Tabla 7. Recuentos celulares totales en BAL

Strain	Group	cels/mLx10 ⁻³	P		Mean Δ [95% CI]	
Wistar	Control	971.67 ± 188.02	-	-	-	-
	Exposed	1042.50 ± 160.95	0.784*	-	70.83 [-471.10, 612.77]*	-
	Rested	1120.00 ± 188.98	0.568 [†]	0.765 [‡]	148.33 [-393.60, 690.27] [†]	77.50 [-464.43, 619.43] [‡]
Brown Norway	Control	706.67 ± 57.67	-	-	-	-
	Exposed	812.50 ± 117.26	0.512*	-	105.83 [-230.31, 441.98]*	-
	Rested	923.33 ± 142.24	0.190 [†]	0.493 [‡]	216.67 [-119.48, 558.81] [†]	110.83 [-225.31, 446.98] [‡]
C57BL/6	Control	130.00 ± 19.71	-	-	-	-
	Exposed	109.17 ± 7.57	0.569*	-	-20.83 [-97.17, 55.50]*	-
	Rested	175.00 ± 38.45	0.228 [†]	0.086 [‡]	45.00 [-31.34, 121.34] [†]	65.83 [-10.50, 142.17] [‡]

Datos referidos a media ± error estándar de la media. Mean Δ [95% CI]: intervalo de confianza del 95% de la diferencia media, como estimación del tamaño de los efectos. *: grupo expuesto de punto de corte temprano *versus* grupo control. †: grupo expuesto de punto de corte tardío *versus* grupo control. ‡: animales expuestos, punto de corte tardío *versus* temprano.

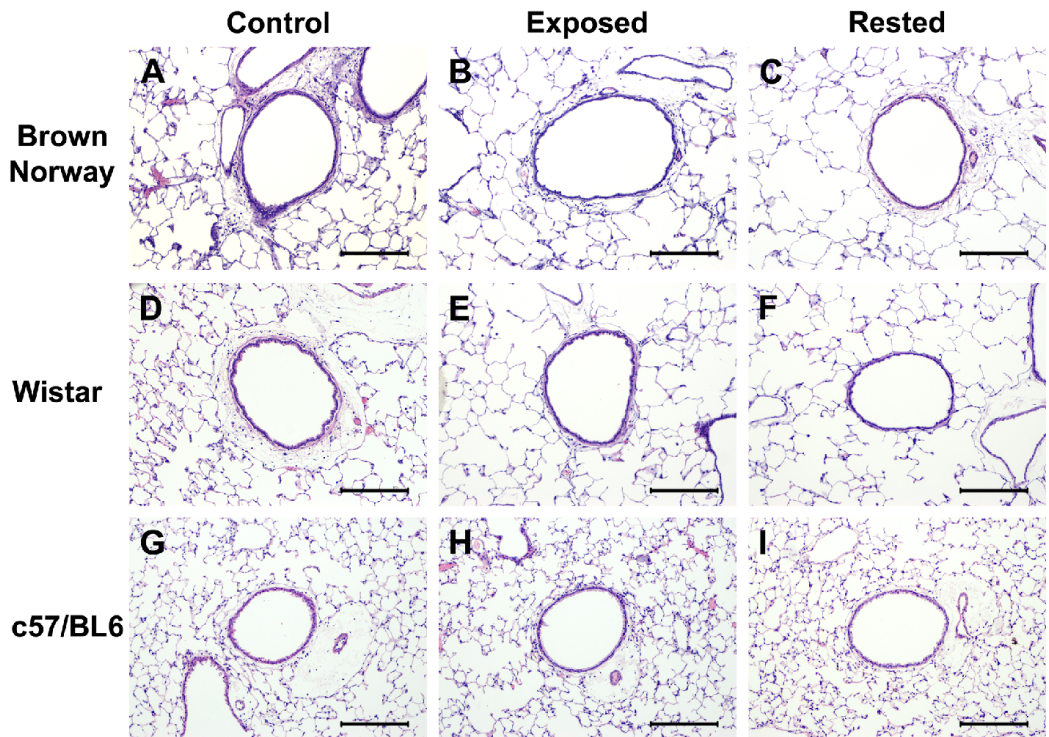


Figura 16. Secciones pulmonares, tinción hematoxilina-eosina. Los paneles muestran cortes transversales de vías respiratorias correspondientes a los distintos grupos experimentales y cepas respectivas de rata y ratón, según se indica. En varias imágenes (*ej.* panel A) son visibles vasos acompañantes de la circulación pulmonar. No existe sangre visible en el interior de los vasos, debido al lavado del circuito vascular pulmonar que se realiza durante el proceso de disección. No se aprecian signos histopatológicos de inflamación ni remodelación de vías respiratorias en ninguna de las cepas ni condiciones experimentales. Barras de escala = 200 μ m.

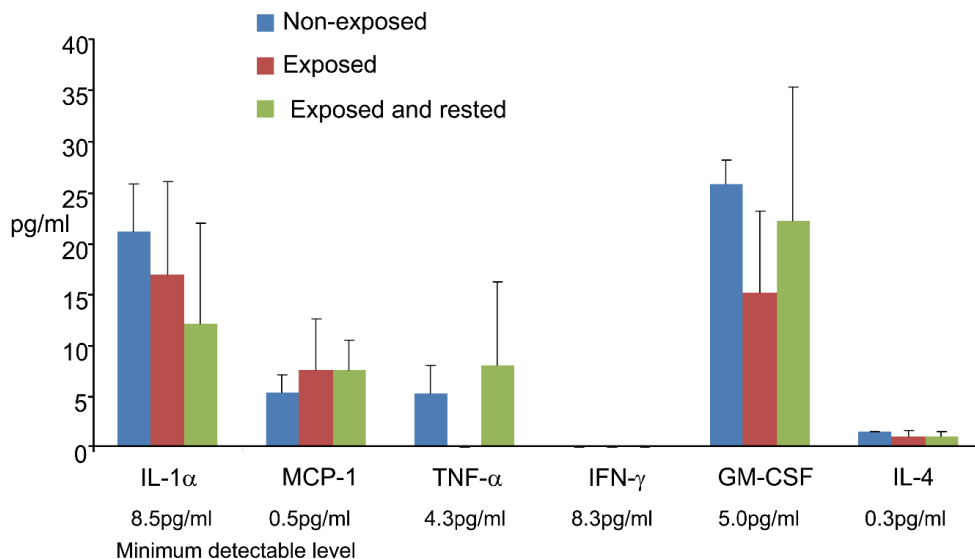


Figura 17. Análisis de citoquinas en sobrenadante de BAL (concentración, pg/mL). Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media. El análisis, realizado a modo exploratorio mediante un *kit* multiplex FlowCytomix™ de micropartículas marcadas BAL. IFN- γ resultó por debajo del umbral de detección. La prueba se limitó, a modo demostrativo y por razones de coste-efectividad, a la cepa de rata Brown Norway. No se hallaron diferencias consistentes sugerentes de inducción de actividad inflamatoria por exposición a VOCs.

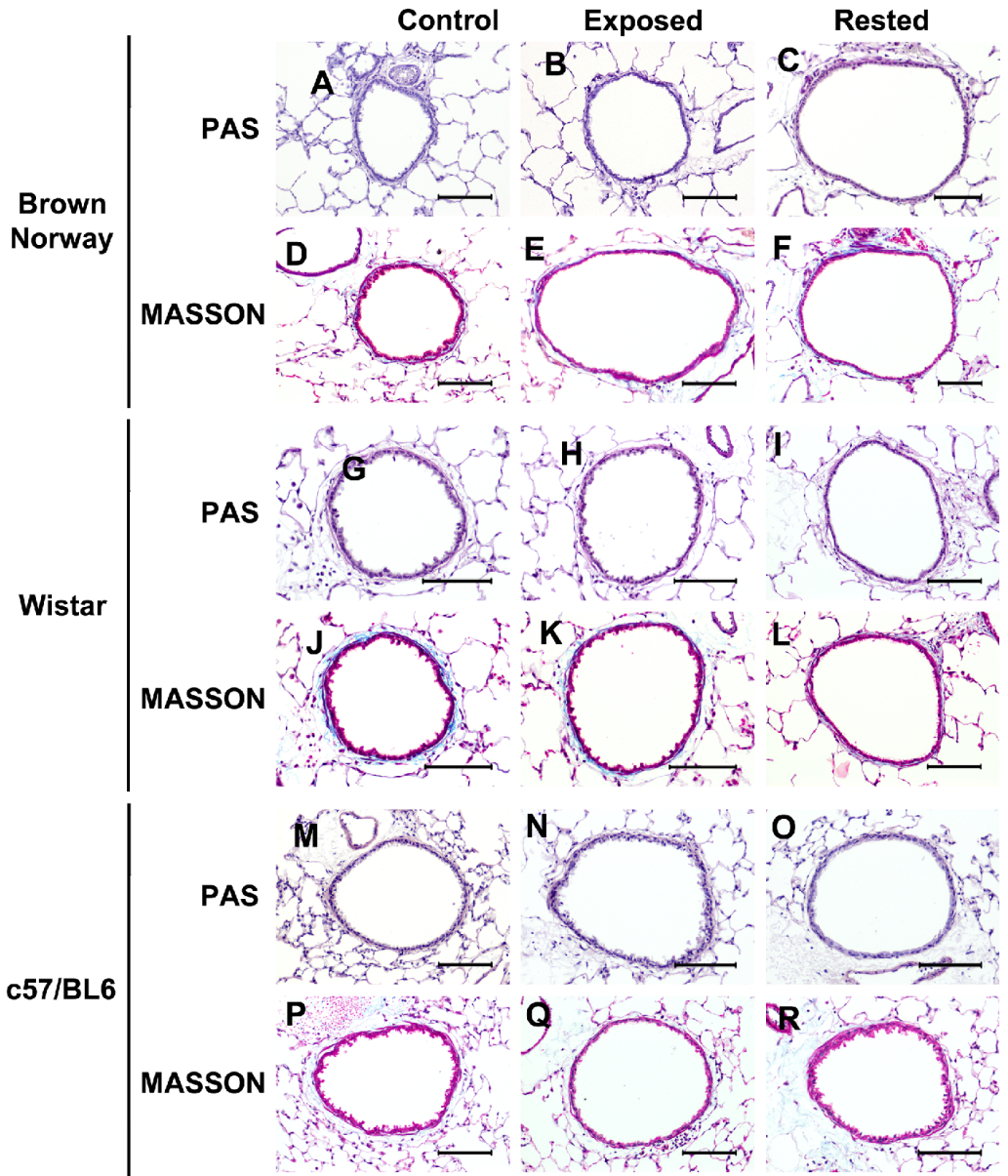


Figura 18. Tinciones de PAS y tricrómico de Masson sobre secciones pulmonares. Los paneles muestran secciones transversales de vías respiratorias en las distintas cepas y condiciones experimentales según se indica. En consistencia con la ausencia de signos de inflamación o remodelación de vías respiratorias en el examen histopatológico

general de las secciones teñidas mediante hematoxilina-eosina, las respectivas tinciones aquí mostradas no revelaron diferencias en la cantidad o carga de las células caliciformes productoras de moco (tinción PAS) ni en el depósito subepitelial de matriz extracelular (tricrómico de Masson). Barras de escala = 100 μ m.

3. La exposición a VOCs induce enfisema pulmonar subpleural en ratas

Las ratas Brown Norway y Wistar desarrollaron una forma peculiar de enfisema pulmonar de localización predominantemente subpleural tras la exposición de tres semanas a VOCs, y estas lesiones permanecieron o se incrementaron en el punto de corte tardío tras la interrupción de la exposición (Fig. 19 y Tablas 8 y 9). Las ratas Wistar mostraron un aumento significativo en L_m en el punto de corte temprano tras la exposición de 3 semanas a VOCs ($P=0,022$ versus grupo control) y en el punto de corte tardío ($P<0,001$ versus grupo control), donde asimismo se mostró una significativa destrucción del parénquima pulmonar en comparación con el punto de corte temprano ($P=0.034$). Las ratas Brown Norway mostraron asimismo una destrucción significativa de parénquima pulmonar en el punto de corte temprano tras la exposición ($P=0.031$ versus grupo control) y en el punto de corte tardío ($P<0,001$ versus grupo control). En el punto de corte tardío, las ratas Brown Norway mostraron igualmente una disminución significativa en la densidad volumétrica de parénquima pulmonar medida mediante el método de extracción digital en comparación con el punto de corte temprano ($P=0,035$), aunque las mediciones mediante L_m solamente alcanzaron significación limítrofe para esta comparación ($P=0,075$). En ambas cepas, las ratas expuestas a VOCs no mostraron inflamación ni rasgos histopatológicos de remodelación de vías respiratorias (Figs. 16 y 18). Los ratones C57BL/6 expuestos no mostraron cambios patológicos en el parénquima pulmonar en comparación con el grupo control (Fig. 19 y Tablas 8 y 9).

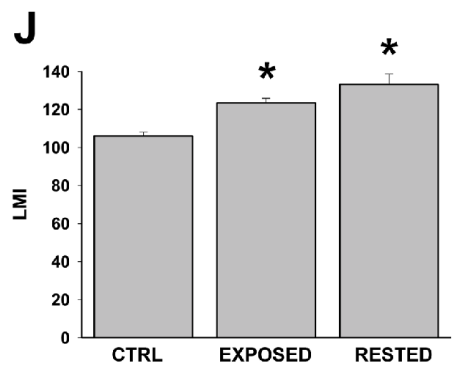
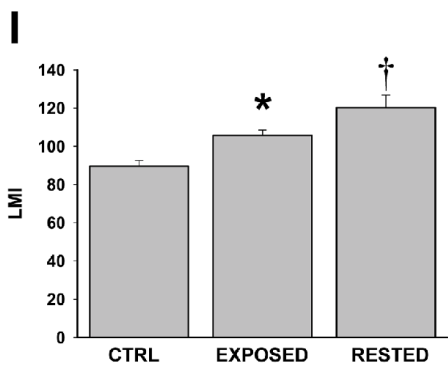
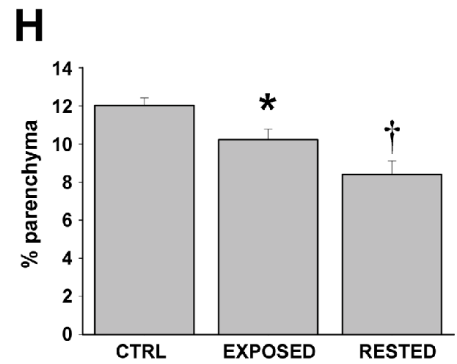
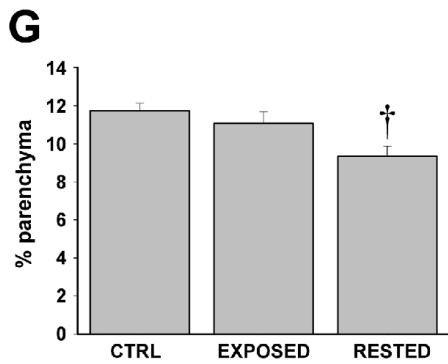
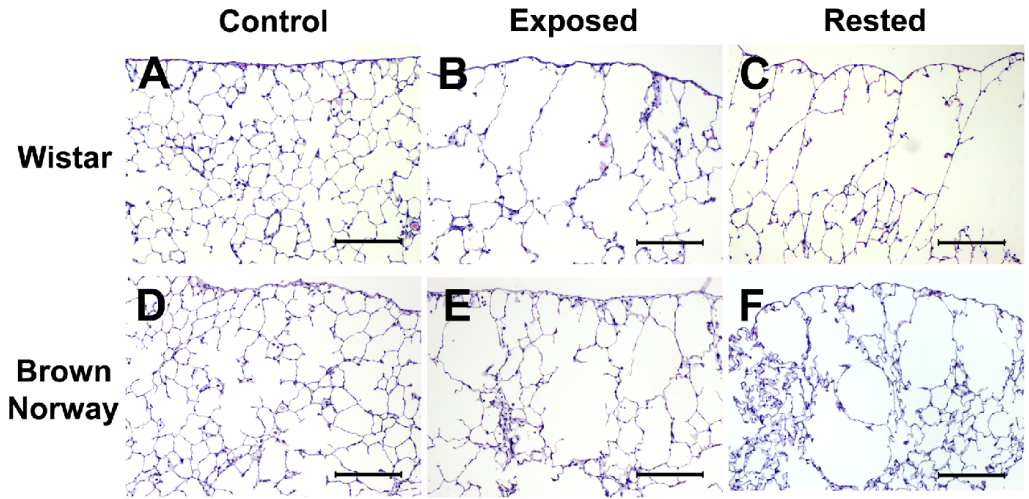


Figura 19. Evaluación de enfisema pulmonar. **(A-F)** Secciones pulmonares teñidas con hematoxilina-eosina, mostrando parénquima en región subpleural (pleura en posición superior en todos los paneles). Cepas de rata y grupos experimentales según se indica. Durante el proceso de fijación, los pulmones se inflaron a presión estandarizada mediante infusión intratraqueal regulada del agente fijador. En los animales expuestos se puede apreciar la destrucción de paredes alveolares en el punto de corte temprano tras finalizar la exposición (B, E) y en el punto de corte tardío tras el lapso libre de exposición (C, F). Ambas cepas de rata, con desviación inmunitaria constitutiva diferente, fueron sensibles a este efecto. **(G-J)** Morfología cuantitativa del enfisema realizada mediante cálculo de densidad volumétrica (V_v) a partir de la extracción digital del parénquima pulmonar (G-H) y mediante el índice *mean linear intercept*, L_m (I-J). (G, I) Ratas Wistar. (H, J) Ratas Brown Norway. Ambos métodos de medición fueron sensibles a la detección del enfisema, expresado como disminución del porcentaje volumétrico de parénquima (G-H) o incremento del L_m (I-J), respectivamente. Los datos numéricos del procedimiento más sensible en cada caso mostraron que el enfisema, establecido en el punto de corte temprano, progresó significativamente en el punto de corte tardío a pesar de la interrupción de la exposición a VOCs. *: $P < 0.05$ versus grupo control (CTRL). †: $P < 0.05$ versus CTRL y punto de corte temprano ("EXPOSED"). Barras de escala en (A-F) = 200 μm .

Tabla 8. Cuantificación de enfisema pulmonar mediante densidad volumétrica

Strain	Group	% parenchyma	<i>P</i>		Mean Δ [95% CI]	
Wistar	CONTROL	11.73 \pm 0.40	-	-	-	-
	EXPOSED	11.08 \pm 0.61	0.398*	-	-0.64 [-2.22, 0.93]*	-
	RESTED	9.34 \pm 0.54	0.006 [†]	0.032 [‡]	-2.39 [-3.96, -0.81] [†]	-1.74 [-3.32, -0.17] [‡]
Brown Norway	CONTROL	12.13 \pm 0.39	-	-	-	-
	EXPOSED	10.25 \pm 0.54	0.031*	-	-1.89 [-3.58, -0.19]*	-
	RESTED	8.41 \pm 0.71	<0.001 [†]	0.035 [‡]	-3.72 [-5.42, -2.03] [†]	-1.84 [-3.53, -0.14] [‡]

La región subpleural se muestreó mediante campos consecutivos de microscopía en cada animal. Para cada animal se genera un dato único que resulta del promedio de los campos muestreados, el cual representa el porcentaje de superficie tisular seccionada de parénquima pulmonar, extraída y medida digitalmente, sobre la superficie total muestreada. Los datos presentados son la media \pm error estándar de la media de los animales de cada cepa y grupo experimental, respectivamente. Mean Δ [95% CI]: intervalo de confianza del 95% de la diferencia media (tamaño del efecto). *: grupo expuesto de punto de corte temprano ("EXPOSED") *versus* grupo control. †: grupo expuesto de punto de corte tardío ("RESTED") *versus* grupo control. ‡: animales expuestos, punto de corte tardío *versus* temprano.

Tabla 9. Cuantificación de enfisema pulmonar mediante *mean linear intercept*

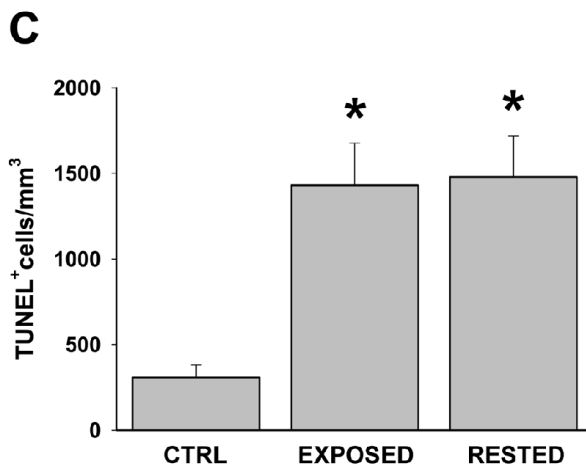
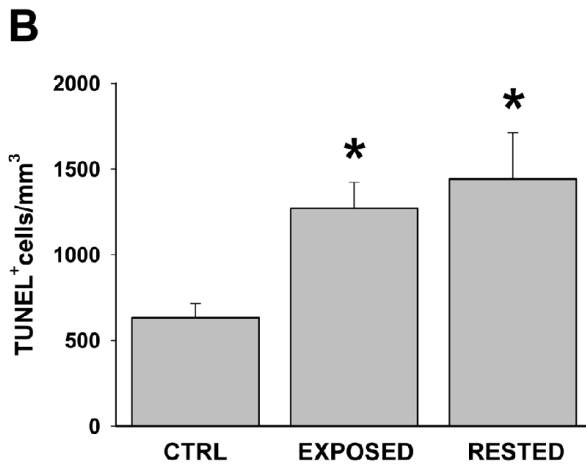
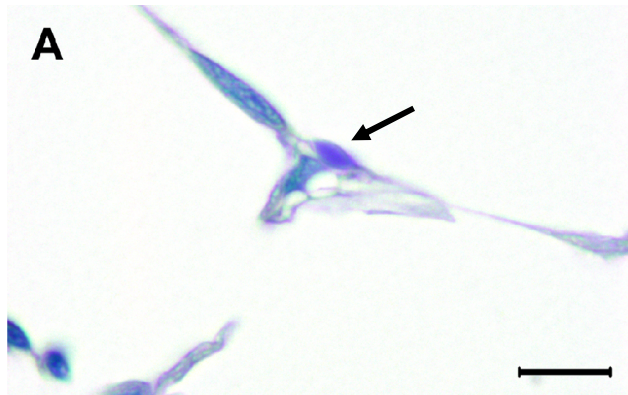
Strain	Group	Lm	P		Mean Δ [95% CI]	
Wistar	CONTROL	89.73 \pm 2.88	-	-	-	-
	EXPOSED	105.70 \pm 2.88	0.022*	-	15.97 [2.62, 29.31]*	-
	RESTED	120.31 \pm 6.50	<0.001 [†]	0.034 [‡]	30.58 [17.23, 43.92] [†]	14.61 [1.27, 27.95] [‡]
Brown Norway	CONTROL	106.07 \pm 1.98	-	-	-	-
	EXPOSED	123.31 \pm 2.57	0.005*	-	17.24 [6.20, 28.29]*	-
	RESTED	133.22 \pm 5.46	<0.001 [†]	0.075 [‡]	27.15 [16.10, 38.19] [†]	9.91 [-1.14, 20.95]

El parénquima pulmonar de la región subpleural se muestreó mediante campos de microscopía consecutivos y se sometió a medición mediante el índice Lm, generándose un valor total único para cada animal. Los datos presentados son la media \pm error estándar de la media para cada cepa y grupo experimental. Mean Δ [95% CI]: intervalo de confianza del 95% de la diferencia media (tamaño del efecto). *: grupo expuesto de punto de corte temprano ("EXPOSED") *versus* grupo control. †: grupo expuesto de punto de corte tardío ("RESTED") *versus* grupo control. ‡: animales expuestos, punto de corte tardío *versus* temprano.

4. La exposición a VOCs del fuel induce un aumento en la apoptosis de neumocitos

Para obtener evidencia adicional sobre el desarrollo de enfisema pulmonar en las ratas expuestas a VOCs e investigar su mecanismo de producción, se procedió a la detección de células apoptóticas en parénquima pulmonar mediante la técnica de TUNEL, y su recuento mediante morfología cuantitativa (Figs. 20 y 21). Ambas cepas de rata, Wistar y Brown Norway, mostraron un aumento significativo en la frecuencia de neumocitos TUNEL⁺ en el punto de corte temprano tras el período de 3 semanas de inhalación de VOCs en comparación con los grupos control respectivos no expuestos (Figs 20B-C y 21, y Tabla 10). Este incremento de neumocitos TUNEL⁺ persistió después de 2 semanas libres de exposición, en el punto de corte tardío (Figs. 20 y 21).

Figura 20 (página siguiente). Detección de células apoptóticas en parénquima pulmonar mediante técnica de TUNEL. **(A)** Micrografía de alta resolución mostrando un neumocito tipo I TUNEL⁺ (flecha, núcleo celular púrpura). **(B-C)** Morfología cuantitativa de la frecuencia de neumocitos apoptóticos, medida como densidad numérica en volumen (N_V) mediante estereología en secciones gruesas de tejido. Cepas Wistar y Brown Norway, respectivamente. *: $P < 0.05$ versus grupo control (CTRL). Barra de escala en (A) = 10 μ m.



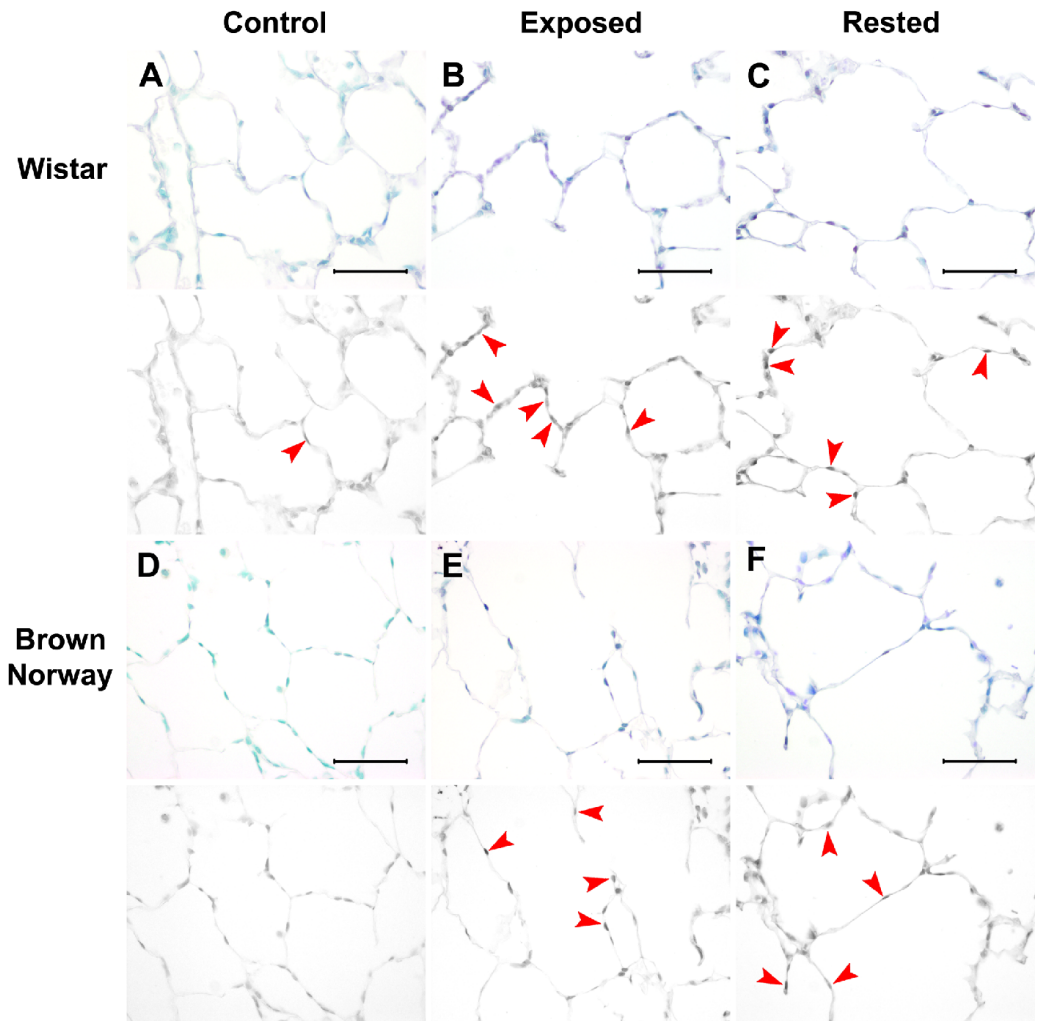


Figura 21. Localización histopatológica de neumocitos TUNEL⁺. Los neumocitos apoptóticos (flechas) se identifican mediante barrido microscópico a alta resolución y magnificación. En la presente figura se muestran en micrografías de bajo aumento para ilustrar su localización en contexto histológico. Para cada cepa de rata y grupo experimental se muestran imágenes de campo claro (paneles superiores A-C y D-F), y réplicas de las mismas imágenes en los paneles inferiores respectivos, con los neumocitos apoptóticos señalados. Se puede apreciar visualmente el incremento de frecuencia de los mismos en los animales expuestos a VOCs. Barras de escala = 50 μ m.

Tabla 10. Densidad numérica de neumocitos TUNEL⁺

Strain	Group	Tunel ⁺ / mm ³	<i>P</i>		Mean Δ [95% CI]	
Wistar	Control	631.36 ± 84.09	-	-	-	-
	Exposed	1271.48 ± 150.61	0.016*	-	640.12 [142.76, 1137.48]*	-
	Rested	1441.38 ± 270.82	0.012 [†]	0.537 [‡]	810.02 [206.60, 1413.44] [†]	169.90 [-405.44, 745.24] [‡]
Brown Norway	Control	306.91 ± 75.31	-	-	-	-
	Exposed	1430.42 ± 246.48	<0.001*	-	1123.51 [512.06, 1734.96]*	-
	Rested	1479.75 ± 238.79	<0.001 [†]	0.866 [‡]	1172.84 [561.38, 1784.29] [†]	49.33 [-562.13, 660.78] [‡]

Los datos presentados son la media ± error estándar de la media para cada cepa y grupo experimental. Mean Δ [95% CI]: intervalo de confianza del 95% de la diferencia media (tamaño del efecto). *: grupo expuesto de punto de corte temprano ("Exposed") *versus* grupo control. †: grupo expuesto de punto de corte tardío ("Rested") *versus* grupo control. ‡: animales expuestos, punto de corte tardío *versus* temprano.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha visto incrementada la incidencia de accidentes marítimos que han ocasionado vertidos de petróleo, las comúnmente denominadas mareas negras. Estos vertidos no solo han causado desastres medioambientales ocasionando daños casi irreparables sobre la flora y la fauna de la zona de la catástrofe con unos costes millonarios, sino que también se ha observado que son agentes nocivos que producen problemas en la salud de las personas que participan en las tareas de limpieza del fuel vertido.^{32, 81} Posteriormente a las diferentes catástrofes marítimas con vertidos de petróleo, se realizaron estudios con el fin de evaluar la repercusión de la inhalación de vapores derivados del fuel sobre la salud humana, enfocados principalmente en los efectos agudos y en los síntomas psicológicos, y en menor medida en las alteraciones a largo plazo de la función pulmonar. El daño patológico causado por VOCs derivados del fuel en los pulmones aún no ha sido evaluado, debido a la reversibilidad de la mayoría de los síntomas de la fase aguda pos-exposición (cefaleas, irritación faríngea y conjuntival, eritema, mareos, náuseas, etc...), y a la más difícil accesibilidad al estudio de las vías respiratorias inferiores y parénquima pulmonar. La mayoría de los estudios con pacientes expuestos a compuestos volátiles derivados del petróleo se realizaron de manera ambulatoria.^{46, 58, 61, 62} Estos estudios se centraron en la toma de muestras de sangre, condensado de aire exhalado y mediciones espirométricas, los cuales fueron factibles con equipo transportable. Sin embargo, el uso de un pletismógrafo corporal, una tomografía computarizada o una biopsia endoscópica de pulmón sería óptimo para explorar en profundidad y exactitud el daño pulmonar producido.⁸² Realizar estos análisis en extensas poblaciones de sujetos expuestos con estos procedimientos y equipos complejos en un centro hospitalario de referencia supone obvios inconvenientes logísticos y de coste, lo que podría disminuir la captación de sujetos para este tipo de estudios.

La propuesta, al realizar este estudio experimental, fue profundizar en la naturaleza del daño pulmonar que podría subyacer a los hallazgos observados en los sujetos que estuvieron expuestos a la inhalación de VOCs del fuel vertido por el buque *Prestige*, particularmente los síntomas recogidos y la hiperreactividad bronquial dos años tras la exposición.^{58, 60, 62} Para ello se sometieron a prueba dos cepas de rata y una de ratón con el fin de determinar la variabilidad del modelo experimental y seleccionar la cepa que mejor representase los hallazgos observados en los humanos. Para esta finalidad, los animales fueron expuestos a la inhalación de VOCs generados a partir de un fuel "tipo *Prestige*" durante un periodo de tres semanas en régimen diario de lunes a viernes, y se compararon con grupos control paralelos de animales no expuestos. Se evaluó la reversibilidad de los síntomas y el daño tisular en los grupos expuestos, en dos puntos temporales de corte y recogida de datos: el punto de corte temprano (al tercer día, primer lunes, tras la finalización de la exposición) y el punto de corte tardío (tras o período de "lavado" en ausencia de exposición, de dos semanas de duración). Con ello se pretendió emular, con un inevitable factor exploratorio y de empirismo en el diseño del estudio, una recogida de datos en fase "aguda" tras la finalización de la exposición, y una segunda recogida de datos tras un lapso de tiempo libre de exposición, como correspondió al principal estudio clínico-epidemiológico realizado tras la catástrofe del *Prestige*.^{58, 60, 62} En dicho estudio, el equipo investigador se desplazó a los lugares afectados por la catástrofe empleando un autobús habilitado como centro clínico ambulatorio móvil, para la captación de sujetos expuestos y no expuestos y la recogida de datos *in situ*. El proceso de diseño del proyecto, evaluación y concesión de financiación, montaje de la compleja logística necesaria y su puesta en marcha condujeron a una recogida de datos aproximadamente dos años tras la catástrofe. Ello hizo al estudio ser único en este campo y de especial interés, al demostrar la existencia de síntomas y

signos patológicos en tracto respiratorio inferior, persistentes a los dos años de la finalización de las tareas de limpieza y exposición a los VOCs.

En los resultados obtenidos sobre reactividad de las vías respiratorias frente a broncoprovocación inespecífica con metacolina, las ratas de la cepa Wistar mostraron hiperreactividad tras la exposición a la inhalación de VOCs generados a partir del fuel de características equivalentes al vertido por el buque *Prestige*, y el fenómeno persistió en el punto de corte tardío, tras el periodo de dos semanas libres de exposición. Para determinar si estos resultados se debieron a una respuesta condicionada por la desviación inmunitaria constitutiva hacia respuestas adaptativas T_{helper} tipo 1 (Th1) característica de la cepa Wistar, se reprodujeron los experimentos con el mismo diseño de grupos (control es no expuestos, expuestos en corte temprano y expuestos en corte tardío tras periodo de lavado) utilizando ratas de la cepa Brown Norway, en las que existe una desviación inmunitaria constitutiva hacia respuestas adaptativas T_{helper} tipo 2 (Th2). Las ratas de la cepa Brown Norway expuestas a VOCs reprodujeron la hiperreactividad de vías respiratorias mostrada por las ratas Wistar, tanto en el punto de corte temprano como en el tardío, resultado que apoya la solidez del modelo en cuanto a la representación de una población no consanguínea e inmunológicamente diversa como la humana, y en particular los sujetos que estuvieron expuestos a la inhalación de VOCs del *Prestige* durante las tareas de limpieza. Por el contrario, no se reprodujeron estos resultados en los ratones de la cepa C57/BL, en los cuales los ratones expuestos no mostraron diferencias en la prueba de broncoprovocación con metacolina en comparación con los ratones del grupo control no expuestos. Estos resultados en ratón coinciden observaciones previas que condujeron a estipular que el ratón es un modelo inestable para representar lesiones pulmonares derivadas de una exposición a un compuesto químico.⁸³, hecho atribuible a particularidades de

esta especie en el metabolismo y la fisiología pulmonar en comparación con otros mamíferos más voluminosos como la rata. La rata ofrece una representación de anatomía y fisiología respiratoria y cardiovascular mucho más cercana a la humana. Sin embargo el ratón, entre otras características, tiene un filtro nasal a la inhalación de altísima eficiencia, una ramificación y distribución diferente de las vías respiratorias intrapulmonares, y una práctica ausencia de una red funcional de circulación bronquial sistémica (es decir, la irrigación sanguínea del aparato respiratorio en el ratón procede de forma prácticamente exclusiva de la circulación pulmonar procedente del ventrículo derecho).⁸⁴

Dados los hallazgos sobre incremento de la reactividad bronquial frente a broncoprovocación inespecífica con metacolina en humanos, y el desarrollo de hiperreactividad bronquial franca y sostenida en el punto de corte tardío tras la exposición a VOCs seguida de periodo de lavado que se obtuvo en ambas cepas de rata, una hipótesis obvia planteada fue que esta hiperreactividad bronquial estaría asociada a inflamación y remodelación de vías respiratorias. Sin embargo, contrariamente a esta hipótesis originalmente planteada en el inicio del proyecto, los efectos de la exposición a VOCs resultaron ser "silentes" en las vías respiratorias de conducción intrapulmonar; es decir, no se observaron infiltrados inflamatorios ni signos histopatológicos de remodelación tisular en la pared de las vías respiratorias de los animales expuestos. En el análisis del BAL, no se encontraron diferencias en la fracción sobrenadante en cuanto a la concentración de citoquinas inflamatorias analizadas entre los animales de los grupos expuestos y los animales control no expuestos, ni evidencia de inflamación en los recuentos leucocitarios diferenciales. Estos datos están en concordancia con los resultados de los estudios que se realizaron en humanos que participaron en las tareas de limpieza del vertido de fuel del Prestige, que revelaron un aumento de la frecuencia de los síntomas

respiratorios en el tracto superior e inferior⁵⁸ e hiperreactividad bronquial,^{32, 46, 60-62} con apenas diferencia frente a la espirometría basal⁶² y con concentraciones más altas de los factores de crecimiento VEGF y FGF así como del marcador de estrés oxidativo 8-isoprostano en condensado de aire exhalado, pero ninguna evidencia de actividad inflamatoria.^{62, 63} El mecanismo que causó la hiperreactividad de las vías respiratorias podría ser por tanto independiente de inflamación pulmonar y producirse mediante algún mecanismo alternativo. Al analizar las secciones de tejido de los animales bajo distintas tinciones, las muestras de los grupos de animales expuestos no mostraron diferencias sugerentes de procesos de remodelación de vías respiratorias. No existieron hallazgos relevantes en el análisis referente a la producción de moco o a hiperplasia de células caliciformes en las muestras teñidas mediante técnica PAS, así como tampoco en el depósito de matriz extracelular como reflejo de fibrosis subepitelial en las muestras teñidas mediante tricrómico de Masson, ni en la masa de músculo liso en las muestras teñidas con hematoxilina-eosina. En un trabajo previo en otro ámbito se describió un incremento del número de macrófagos pulmonares en el fluido del BAL y un incremento de la producción de moco en los pulmones de animales expuestos a vapores de aceite cocinado.[Wang, 2010 #6] Esta respuesta celular puede ser plausible debido al relativo tamaño de las partículas derivadas de la combustión, lo cual permite a los macrófagos fagocitar estas sustancia particulada externa. Por el contrario, los VOCs objeto de la exposición en el presente estudio no son materia conformada en partículas sino agentes volátiles de bajo peso molecular, previsiblemente demasiado pequeños para desencadenar una respuesta inmunitaria celular mediada por macrófagos. Estas moléculas carecen asimismo de los epítopos peptídicos y masa molecular necesarios para ser procesados y presentados como antígenos e inducir una respuesta inmunitaria adaptativa vehiculada por células

T CD4⁺ efectoras específicas. En ciertas determinaciones realizadas sobre voluntarios expuestos a VOCs, se encontró un aumento en los mediadores del estrés oxidativo.^{62, 73} Esto puede ser una consecuencia general e inespecífica de daño tisular pulmonar no vehiculado a través de una respuesta inmunitaria celular, o puede resultar asimismo de una colonización microbiana favorecida por unas estructuras tisulares dañadas.

De forma inesperada y no planteada en las hipótesis de partida del estudio, se observó como hallazgo histopatológico relevante el desarrollo de un peculiar patrón de enfisema pulmonar periférico, en localización subpleural, en ambas cepas de rata expuestas. Este enfisema se encontraba ya presente en el punto de corte temprano tras la exposición, e incrementado en el punto de corte tardío tras periodo de lavado, reflejando por tanto una tendencia a su persistencia y extensión tras la finalización de la exposición. Así como no se obtuvo evidencia de actividad inflamatoria en vías respiratorias, este enfisema pulmonar subpleural fue también observado en ausencia de cualquier signo histopatológico de actividad inflamatoria. La evaluación mediante morfología cuantitativa del enfisema mostró áreas dañadas en los pulmones de todas las ratas expuestas. Se observó una disminución significativa en la densidad volumétrica del parénquima pulmonar en esta región, medida mediante extracción digital de las paredes alveolares por técnicas de procesamiento de imagen microscópica del parénquima pulmonar, o mediante el parámetro clásico L_m , menos sensible. El hecho de que el enfisema se observase en ambas cepas de rata con distinta desviación inmunitaria constitutiva, sugiere que el proceso de destrucción pulmonar no fue producido a través de una respuesta inmunitaria adaptativa. La presencia de este enfisema pulmonar, en su peculiar localización limitada subpleural respetando la estructura del resto de los pulmones, puede proporcionar una explicación mecánica a la presencia de hiperreactividad de vías respiratorias frente a la broncoprovocación

inespecífica con metacolina. Según estudios realizados sobre los mecanismos de obstrucción al flujo aéreo e hiperreactividad bronquial, uno de los factores mecánicos contribuyentes es la alteración de la interdependencia vía aérea-parénquima; es decir, la disminución de la fuerza de retracción elástica debida a la destrucción de parte del parénquima pulmonar hace a las vías respiratorias más colapsables y con ello más sensibles a estímulos broncoconstrictores.^{85, 86} Este fenómeno también fue descrito en pacientes con EPOC,^{87, 88} y se ha propuesto que la reactividad de las vías respiratorias en pacientes con EPOC puede estar primariamente determinada por las modificaciones mecánicas derivadas de la destrucción del parénquima pulmonar, y no directamente por la inflamación de las vías respiratorias.⁸⁹ En el trabajo de la presente tesis, no se encontró ninguna evidencia de actividad inflamatoria en las vías respiratorias ni en el parénquima pulmonar de los animales expuestos a VOCs, a través de los exámenes realizados (recuentos leucocitarios totales y diferenciales en BAL, medición de concentración de citoquinas en sobrenadante de BAL y examen histopatológico directo de secciones pulmonares). En ausencia de inflamación pulmonar y sin evidencia asimismo de remodelación de las vías respiratorias, el enfisema pulmonar subpleural hallado, que engloba a los pulmones en toda su periferia, puede ser la causa de la hiperreactividad de vías respiratorias detectada en los animales expuestos. La posible traslación de este hallazgo y mecanismo a sujetos humanos expuestos a inhalación de VOCs en altas dosis tras catástrofes del tipo de la del buque *Prestige* es especulativa, dada la inexistencia de estudios de imagen pulmonar en poblaciones de este tipo, mediante las técnicas que serían necesarias (TAC de alta resolución) para la detección de un enfisema pulmonar que podría no ser intenso, y con distribución limitada a la región subpleural si se reprodujese el patrón observado en los animales.

Para obtener evidencia adicional sobre la producción de enfisema pulmonar y una exploración básica de su mecanismo, se procedió a la detección de neumocitos apoptóticos empleando para ello la técnica denominada TUNEL, que identifica el ADN fragmentado por caspasas como estadio final que conduce a la muerte celular programada. Previamente a este estudio se había publicado que la exposición a VOCs derivados de fuel puede inducir daño en el ADN de las células pulmonares de aves similar al descrito en células de la sangre de las personas que asimismo estuvieron expuestas.⁷⁵ Un acúmulo elevado de daño de ADN en el pulmón puede inducir apoptosis de las células estructurales, lo cual es un mecanismo de producción de enfisema.^{90, 91} Para investigar esta posibilidad, se aplicó en el presente estudio la técnica de TUNEL sobre secciones pulmonares de los grupos de ratas expuestas y grupos control. Los grupos control, tanto de las ratas de la cepa Wistar como de las ratas Brown Norway, mostraron una determinada frecuencia basal de neumocitos TUNEL⁺, atribuible al mecanismo fisiológico de recambio celular para el mantenimiento de la homeostasis tisular. sobre esta línea de base, las ratas de ambas cepas expuestas a VOCs mostraron un incremento significativo en la frecuencia de neumocitos TUNEL⁺, particularmente en las zonas de parénquima pulmonar adyacentes a las áreas de enfisema. Dada la evidencia de daño de ADN en distintos sistemas orgánicos y especies tras la exposición a los VOCs del fuel derramado por el buque *Prestige*,⁷⁵ se puede razonar que el daño infligido en los neumocitos podría desarrollarse progresivamente desde estadios tempranos tras la exposición, sin una contribución directa del sistema inmunitario, lo cual es coherente con el "silencio" de actividad inflamatoria observado en este estudio experimental en ambos puntos de corte de obtención de datos, y consistente con los datos recogidos en los estudios sobre los sujetos humanos expuestos. Una vez sobrepasado cierto umbral de daño acumulado de ADN, se desencadenaría apoptosis a través de las vías de

muerte celular programada pre-programadas a este efecto. La localización subpleural del enfisema, es decir, en la región más periférica de intercambio de gases del parénquima pulmonar, puede ser explicable por el bajo peso molecular y naturaleza volátil de los VOCs, los cuales no son materia particulada y pueden no tener interacción biológica significativa a lo largo de todo el árbol de vías aéreas de conducción hasta las más periféricas, y se concentrarían en el "fondo de saco" que supone la zona pulmonar más periférica, en la cual el flujo de aire alcanza un valor de prácticamente cero durante la ventilación.

En resumen, como recolección de los hallazgos más relevantes en el presente estudio, la exposición experimental a VOCs generados a partir de fuel "tipo Prestige" originó hiperreactividad bronquial, la cual fue persistente tras un periodo de lavado posterior a la exposición. Dicha hiperreactividad bronquial se produjo en ausencia de signos de actividad inflamatoria y remodelación de vías respiratorias, y se asoció al desarrollo de un peculiar patrón de enfisema pulmonar de localización subpleural. Aunque los datos sobre los efectos biológicos y clínicos de la exposición a VOCs son en general escasos, la información existente sugiere que los VOCs pueden producir daño de ADN en zonas orgánicas de estacionamiento o concentración de los mismos, como puede ser la región más periférica del aparato respiratorio. A partir de cierto umbral, el acúmulo celular de daño de ADN puede por sí mismo desencadenar apoptosis a partir de vías pre-programadas de muerte celular. Es por ello plausible que el enfisema pulmonar observado en este estudio no sea resultado de una respuesta del sistema inmunitario y se haya producido, en coherencia con las observaciones realizadas, en completa ausencia de inflamación. Dicho enfisema, puede asimismo proporcionar una explicación mecánica a la presencia de hiperreactividad bronquial, al disminuir la retracción elástica del parénquima pulmonar de una forma envolvente y alterarse el

equilibrio de fuerzas denominado interdependencia entre vía aérea y parénquima pulmonar.

Resumen y consideraciones finales

El 19 de noviembre del 2002, el petrolero Prestige se hundió frente a las costas gallegas, produciéndose el vertido de parte de las 77.000 toneladas de fuel pesado que transportaba, ocasionando uno de las mayores catástrofes medioambientales de la historia. Con el fin de limpiar las costas afectadas, alrededor de 300.000 personas participaron en las tareas de limpieza, realizándose la mayoría de manera manual. A raíz de la catástrofe se llevaron a cabo varios estudios para determinar el daño ocasionado por la inhalación de VOCs derivados del fuel en las personas implicadas en estas labores de limpieza, en los que se observaron efectos persistentes en el sistema respiratorio, entre otros síntomas. Por ello el objetivo principal de este proyecto fue desarrollar un estudio experimental de patología pulmonar producida por la exposición a fuel tipo “Prestige”, utilizando un modelo animal con la finalidad de explorar los mecanismos de patología pulmonar persistente.

La puesta en marcha de este estudio requirió una compleja colaboración multidisciplinar entre varias entidades implicadas de la academia y la industria. Exploratoriamente se seleccionaron para la exposición a VOCs cepas de rata y ratón con distinto perfil constitutivo de respuesta inmunitaria adaptativa, en previsión de una respuesta variable y no predecible *a priori*, bajo la idea de partida de que los efectos de la inhalación de VOCs estarían de forma importante vehiculados a través de vías efectoras del sistema inmunitario. Asimismo, con la finalidad de representar los efectos inmediatos tras la exposición y los efectos presentes tras un periodo libre de exposición, emulando la recogida de datos tras un lapso posterior a la exposición en el

principal estudio epidemiológico realizado en las áreas afectadas por el vertido, se diseñó este estudio experimental con dos puntos de corte y recogida de datos, temprano y tardío respectivamente. Para llevar a cabo la exposición experimental, se diseñó *ad hoc* un sistema de generación de VOCs e inhalación controlada, en colaboración con la compañía británica Electro-Medical Measurement Systems (EMMS, London, UK), la cual realizó a su vez consultas de asesoría con la Sociedad Británica de Toxicología. El equipo constó básicamente de una cámara de vaporización de fuel y una torre de exposición de flujo vertical, diseñada para estudios de farmacología y toxicología inhalatoria en roedores de laboratorio, con la que se garantizaba la exposición controlada y homogénea en todos los roedores. Con la finalidad de que el fuel y VOCs derivados representasen cercanamente el vertido del buque *Prestige*, se contó con la colaboración de Repsol S.A., entidad que en la refinería experimental de su centro de I+D+i sintetizó un fuel para la finalidad de este estudio. Adicionalmente, la composición en VOCs del aire suministrado por el equipo experimental a los puertos de inhalación de los animales se verificó mediante espectrometría de gases, a través de la asesoría y prestación de este servicio por los *Servicios de Asistencia á Investigación* (SAI) de la *Universidade da Coruña*, donde se llevó a cabo un análisis estándar de contenido BTEX (benceno, tolueno, etil-benceno y xilenos) en la totalidad del aire suministrado en una sesión de exposición completa, y se compararon los resultados con las mediciones de campo realizadas por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Ministerio de Ciencia y Educación, Gobierno de España) sobre los vertidos de la catástrofe durante las tareas de limpieza.

En los animales expuestos en comparación con controles no expuestos, se realizaron mediciones de reactividad bronquial a metacolina mediante un equipo de ventilación mecánica y función pulmonar para roedores de laboratorio. Seguidamente, en las muestras biológicas obtenidas de los

animales, se llevó a cabo el análisis de la respuesta inmunitaria y análisis estructural de remodelación patológica de estructuras pulmonares, con los resultados referidos. En concordancia con los datos obtenidos en sujetos humanos, los animales expuestos a los VOCs del fuel desarrollaron hiperreactividad de vías respiratorias que se mantenía en el punto tardío de corte de datos, tras un período de lavado libre de exposición. Sin embargo, contrariamente a las hipótesis de partida del estudio, no se halló en asociación a tal hiperreactividad de vías respiratorias ninguna evidencia de respuesta inmunitaria, inflamación ni remodelación de vías respiratorias en los animales expuestos. Como hallazgo inesperado, se observó y midió mediante morfología cuantitativa una forma peculiar de enfisema pulmonar de distribución subpleural en estos animales, la cual puede proporcionar una explicación mecánica al fenómeno de la hiperreactividad de vías respiratorias en ausencia de inflamación y remodelación. El hallazgo de esta forma de enfisema nos condujo, como verificación adicional y exploración de su mecanismo de producción, al análisis mediante técnica de TUNEL y morfología cuantitativa en secciones pulmonares, de la frecuencia de apoptosis de neumocitos en las paredes alveolares, obteniéndose un resultado positivo consistente con la presencia del enfisema. Este conjunto de datos, junto con la evidencia previamente publicada de que los VOCs del vertido del buque *Prestige* producían daño en el ADN de animales y humanos en distintas localizaciones orgánicas, conduce a sugerir que el enfisema pulmonar subpleural se produce por apoptosis de neumocitos, la cual es a su vez inducida por activación de vías de muerte celular programada una vez sobrepasado cierto umbral de daño de ADN en esta región distal del aparato respiratorio, susceptible probablemente a una retención local y mayor efecto de los VOCs.

La traslación de estos resultados a los humanos expuestos a la inhalación de VOCs tras la catástrofe del buque *Prestige* o eventos similares es

especulativa en el momento del cierre de la presente tesis doctoral, y plantea complejas cuestiones sobre la pertinencia, logística y coste-efectividad de un estudio orientado a esta finalidad, al menos en el caso específico Prestige, las cuales superan el alcance de esta tesis.

CONCLUSIONES

1. El abordaje multidisciplinar del presente proyecto, incluyendo la colaboración con Repsol (síntesis de fuel tipo "Prestige" en la refinería experimental de su centro de Innovación y Desarrollo), EMMS (soporte de ingeniería para el diseño y construcción del equipo de exposición y consultoría con la Sociedad Británica de Toxicología) y los Servicios de Apoyo a la Investigación de la *Universidade da Coruña* (análisis mediante espectrometría de gases y validación de los VOCs en los puntos de exposición inhalatoria de los animales de experimentación) permitieron desarrollar un modelo experimental representativo, dentro de las posibilidades alcanzables a través de estos recursos, de la exposición a VOCs ocurrida durante las tareas de limpieza de costas tras la catástrofe del buque Prestige.
2. Las cepas de rata Wistar y Brown Norway mostraron hiperreactividad de vías respiratorias frente a la broncoprovocación con metacolina en el momento de medición inmediata tras finalizar el periodo de exposición a inhalación de VOCs. Dicha hiperreactividad bronquial se mantuvo tras el periodo de lavado, libre de exposición. Estos hallazgos pueden reflejar la tendencia a la hiperreactividad bronquial, como expresión cuantificada asociada a síntomas respiratorios, observada en los humanos expuestos a los VOCs del fuel del Prestige en el estudio epidemiológico realizado tras un lapso de tiempo una vez finalizada la exposición.
3. En ninguna cepa de animales expuestos se observaron signos de respuesta inmunitaria efectora con inflamación, mediante las técnicas de examen histopatológico pulmonar, determinación de recuentos leucocitarios diferenciales en lavado broncoalveolar, o análisis de concentración de citoquinas en el mismo.
4. Ninguna de las cepas expuestas de animales mostró signos histopatológicos de remodelación de vías respiratorias. Sin embargo, al

nivel del parénquima pulmonar, las cepas de rata Wistar y Brown Norway mostraron una forma atípica de enfisema pulmonar, de distribución periférica (subpleural). El análisis de secciones pulmonares mediante la técnica TUNEL mostró una frecuencia incrementada de apoptosis de neumocitos en las regiones afectadas por el enfisema pulmonar, proporcionando una demostración adicional y mecanicista de la producción de este enfisema. La presencia de dicho enfisema circundando la periferia del parénquima pulmonar puede desde un punto de vista mecánico explicar la hiperreactividad bronquial en ausencia de inflamación y remodelación directa de vías respiratorias, mediante una alteración de la interdependencia mecánica entre vías respiratorias y parénquima pulmonar con facilitación de la oclusión de vías respiratorias distales frente a un estímulo colinérgico, y generación de obstrucción al flujo aéreo en la prueba de metacolina. Los mecanismos inductores de apoptosis de neumocitos y producción de este patrón peculiar de enfisema pulmonar se escapan del alcance del presente estudio, pero datos publicados previamente sobre la capacidad de los VOCs del evento Prestige para producir daño de ADN sugieren que éste puede ser el evento primario desencadenante de apoptosis de neumocitos en la región más distal del aparato respiratorio, probablemente proclive a una más intensa concentración y efecto de agentes tóxicos volátiles, no particulados y de bajo peso molecular. No existen datos que permitan corroborar si este hallazgo, detectado en el modelo experimental, representa un fenómeno fisiopatológico que efectivamente ocurra en humanos expuestos a inhalación de VOCs en catástrofes de esta naturaleza.

REFERENCIAS

1. Diccionario Enciclopédico Larousse. Ed. 2012.
2. González D. Asphaltene-Controlling Additive compound for oil. WO2012002790A Patent. 2012.
3. Ajram K. Miracle of Islamic Science, Appendix B. Knowledge House Publishers, ISBN 0-911119-43-4. 1992.
4. Zayn Bilkadi, University of California, Berkeley. "The Oil Weapons", Saudi Aramco World, January-February 1995, p. 20-27.
5. Halliday, Fred. The Middle East in International Relations: Power and Ideology. Cambridge University Press: USA, 270. 2005.
6. Krylov NY, Bokserman AA, Stavrovsky ER. The Oil Industry of the Former Soviet Union. CRC Press, 1998.
7. Shirin Akiner, Anne Aldis. The Caspian: Politics, Energy and Security. Routledge, 2004.
8. Según Tatyana Saiko. Environmental Crises. Pearson Education, 2000.
9. Frank, Alison Fleig. Oil Empire: Visions of Prosperity in Austrian Galicia (Harvard Historical Studies). Harvard University Press. 2005.
10. Otalora Vargas, J.S. Petroleum Industry. Atlantic International University. 2012. Disponible en:
<http://www.aiu.edu/applications/DocumentLibraryManager/upload/1-8262012-132112-263749219.docx>.
11. Library of Central Intelligence Agency. "Country comparison:oil-proved reserves". 2013. Disponible en: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/rankorder/2244rank.html>.
12. Riberos Montero, S.M. Industria del Petroleo y sus derivados. Universidad Internacional de Santander. 2010. Disponible en:
<https://es.scribd.com/doc/111866587/Industria-Petrolera>.
13. Ministerio de Agricultura, Alimentacion y Medioambiente. Gobierno de España. El trafico Maritimo. 2014. Disponible en:
http://www.magrama.gob.es/es/costas/temas/proteccion-medio-marino/plan-ribera/contaminacion-marina-accidental/trafico_maritimo.aspx#.
14. Fundacion de Nuestro Mar. Movimiento de Petróleo a través de puntos estratégicos. 2009. Disponible en:

- http://www.nuestromar.com/noticias/politica_y_economia/08_03_2011/35954_movimiento_maritimo_del_petroleo.
15. Centro Tecnológico del Mar - Fundación CETMAR. Mareas Negras. 2011. Disponible en: http://www.cetmar.org/documentacion/mareas_negras_catastrofes.htm.
 16. William C. Dement. The promise of sleep. Editorial Atlántida. 2000.
 17. Digital Branch of the University of Alaska Fairbanks Oral History Program. Project Jukebox. Disponible en: <http://jukebox.uaf.edu/site7/exxonvaldez>.
 18. Melón E, García Melón E, Burgos A, Rubio C, Perera J. La tragedia del "Braer": accidente y contaminación. Universidad de la Laguna. 2008. Disponible en: <http://www.semm.org/cihf/pdf/PosterBraer.pdf>.
 19. Oficina Parlamentaria de Ciencia y Tecnología de UK. El derrame de petróleo del Sea Empress. 1996. Disponible en: <http://www.parliament.uk/documents/post/pn075.pdf>.
 20. Dyrinda P, Symberlist R. Oil pollution following the Sea Empress spill. University of Wales. 2002. Disponible en: <http://www.swansea.ac.uk/empress/oil/pollute.htm>.
 21. Moller TH. The Nakhodka oil Spill Response- The technical adviser's perspective. Paper presentado en la Asociación de Petróleo de Japón (PAJ) Oil Spill Symposium, 10-11 de julio de 1997, Tokio, Japón, Disponible en: http://www.itopf.com/fileadmin/data/Documents/Papers/paj_97.pdf.
 22. Morita A, Kusaka Y, Deguchi Y, Moriuchi A, Nakanaga Y, Iki M, Miyazaki S, Kawahara K. Acute health problems among the people engaged in the cleanup of the Nakhodka oil spill. *Environ Res* 1999;81(3):185-94.
 23. IOPC Funds. Erika incident map. 2000. Disponible en: <http://www.iopcfunds.org/incidents/incident-map/#111-1999-235-December>.
 24. Comisión Europea, Dirección General de Energía y Transporte. Memo - Erika: two year on. 2002. Disponible en: http://ec.europa.eu/transport/maritime/safety/doc/erika/memo_en.pdf.
 25. Ministerio de Ecología, Desarrollo Sostenible y Energía de Francia. Mesures pour la prévention des accidents de pétrolier. 2012. Disponible en: <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Les-mesures-europeennes-Paquet,11569.html>.
 26. Fondo internacional de indemnización de daños debidos a la contaminación por hidrocarburos. Siniestros que afectan a fondos del 1992. 2008. Disponible en:

- <http://documentservices.iopcfunds.org/es/documentos-de-las-reuniones/download/docs/3032/lang/es/>.
27. García Mira R. Lecturas sobre el desastre del Prestige. Instituto de Estudios e Investigación Psicosocial “Xoán Vicente Viqueira”. 2013. Disponible en: http://www.udc.es/dep/ps/grupo/varios/prest_es.pdf.
 28. Mondejar R. Mediación ambiental. Recursos y experiencias. Ed. Dykinson. Madrid 2014. ebook- isbn:8490319995.
 29. Zamora Terres J. La desgracia del Prestige. Universidad Politécnica de Barcelona. 2003. Disponible en: http://marenostum.org/ecologia/medio_ambiente/prestige/desgracia5.htm.
 30. Feal Vazquez J. Un año despues del hundimiento del Prestige. ESPAS. Universidad de la Rioja. 2004. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4580144.pdf>.
 31. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Informe técnico CSIC “Prestige”. Caracterización del vertido y evolución preliminar en el medio. Disponible en: <http://csicprestige.iim.csic.es/desarro/informcsic/1/index.htm>.
 32. Rodríguez-Trigo G, Zock JP, Isidro Montes I. La exposición a las mareas negras y sus efectos en la salud. *Arch Bronconeumol* 2007;43(11):628-35.
 33. Díez de Ulzurum I, Herreros MA. Consideraciones sobre el accidente, la fractura y el hundimiento del Prestige. Universidad Politécnica de Madrid. Disponible en: <http://www.gef.es/Congresos/21/pdf/7-02.pdf>.
 34. Rodríguez M. Prestige: Crónica de una marea negra. Greenpeace. 2002. Disponible en: <http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/other/prestige-cr-nica-de-una-marea.pdf>.
 35. Santos R. Prosigue la limpieza del vertido del ‘Prestige’ y se intensifican las iniciativas para la recuperación ambiental de las zonas afectadas. CEDEX. Artículo Ambienta. 2003. Disponible en: http://hispagua.cedex.es/sites/default/files/hispagua_articulo/ambienta/n20/articulo_4.pdf
 36. Rodríguez M, Marcos P. Reflexiones para evitar otra marea negra. Greenpeace. 2012. Disponible en: http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/cambio_climatico/gp_otroPrestigeesposible.pdf.
 37. Oficina Técnica del Programa de Intervención Científica. Ministerio de Educación y Ciencia. Gobierno de España. Mapa del litoral afectado por el vertido del

Prestige. 2007. Disponible en:
<http://otvm.uvigo.es/accidentprestige/litoralafectado.html>.

38. Cortes Generales. Diario de Sesiones del Congreso de los Diputados. Comisiones. núm. 750, de 06/05/2003. Medidas adoptadas por el Gobierno en relación con las consecuencias del accidente del buque Prestige. Disponible en:
[http://www.congreso.es/portal/page/portal/Congreso/PopUpCGI?CMD=VERLST&BASE=puw7&DOCS=1-1&QUERY=\(CDC200305060750.CODI\)](http://www.congreso.es/portal/page/portal/Congreso/PopUpCGI?CMD=VERLST&BASE=puw7&DOCS=1-1&QUERY=(CDC200305060750.CODI)).
39. Gonzalez Laxe F. Análisis de las consecuencias económicas y sociales de los desastres marítimos: el caso del Prestige. Universidade da Coruña. 2004. Disponible en:
<http://www.udc.es/iuem/documentos/monografias/analisisPrestige.pdf>.
40. Blasco Hedo E. Inidoneidad de la vía penal en el caso del Prestige. *Actualidad Jurídica Ambiental*, 26 de noviembre de 2013. ISSN: 1989-5666 NIPO: 721-13-001-5. Disponible en: http://www.actualidadjuridicaambiental.com/wp-content/uploads/2013/11/2013_11_25_Blasco-Prestige.pdf.
41. Palinkas LA, Petterson JS, Russell J, Downs MA. Community patterns of psychiatric disorders after the Exxon Valdez oil spill. *Am J Psychiatry* 1993;150(10):1517-23.
42. Campbell D, Cox D, Crum J, Foster K, Riley A. Later effects of grounding of tanker Braer on health in Shetland. *BMJ* 1994;309(6957):773-4.
43. Cole J, Beare DM, Waugh AP, Capulas E, Aldridge KE, Arlett CF, Green MH, Crum JE, Cox D, Garner RC, Dingley KH, Martin EA, Podmore K, Heydon R, Farmer PB. Biomonitoring of possible human exposure to environmental genotoxic chemicals: lessons from a study following the wreck of the oil tanker Braer. *Environ Mol Mutagen* 1997;30(2):97-111.
44. Lyons RA, Temple JM, Evans D, Fone DL, Palmer SR. Acute health effects of the Sea Empress oil spill. *J Epidemiol Community Health* 1999;53(5):306-10.
45. Schvoerer C, Gourier-Frery C, Ledrans M, Germonneau P, Derrien J, Prat M, Mansotte F, Guillaumot P, Tual F, Vieuxbled J, Marzin M. Etude épidémiologique des troubles de santé survenus à court terme chez les personnes ayant participé au nettoyage des sites pollués par le fioul de l'Erika. 2000. Disponible en:
http://www.invs.sante.fr/publications/erika3/rapmaree_dist.pdf.
46. Suarez B, Lope V, Perez-Gomez B, Aragones N, Rodriguez-Artalejo F, Marques F, Guzman A, Vilorio LJ, Carrasco JM, Martin-Moreno JM, Lopez-Abente G, Pollan M. Acute health problems among subjects involved in the cleanup operation following the Prestige oil spill in Asturias and Cantabria (Spain). *Environ Res* 2005;99(3):413-24.

47. Gestal Otero J, Smyth Chamosa E, Figueiras Guzmán A, Montes Martínez A. Recollida e limpeza do fuel do Prestige: avaliación da exposición e danos na saúde en voluntarios e traballadores. Universidade de Santiago de Compostela. 2004.
48. Vereá H. La contaminación ambiental y la respiración. Enfermedades respiratorias. Barcelona: Permanyer, 2005.
49. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. US toxicological profile for fuel-oils. 1995. Disponible en: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp75-c2.pdf.
50. Bosch X. Exposure to oil spill has detrimental effect on clean-up workers' health. *Lancet* 2003;361(9352):147.
51. Vereá H, Montero C. Neumonitis por inhalación de humos y gases tóxicos. Manual de enfermedades respiratorias de origen ocupacional. Madrid: Ergón, 2006.
52. Lin S, Jones R, Reibman J, Bowers J, Fitzgerald EF, Hwang SA. Reported respiratory symptoms and adverse home conditions after 9/11 among residents living near the World Trade Center. *J Asthma* 2007;44(4):325-32.
53. Payne JP, Kemp SJ, Dewar A, Goldstraw P, Kendall M, Chen LC, Tetley TD. Effects of airborne World Trade Center dust on cytokine release by primary human lung cells in vitro. *J Occup Environ Med* 2004;46(5):420-7.
54. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Ministerio de Economía y Competitividad. Gobierno de España. Informe Técnico CSIC "Prestige". Comentarios sobre la toxicidad de los residuos de petróleo del Prestige. Disponible en: <http://csicprestige.iim.csic.es/desarro/informcsic/11/info11.htm>.
55. Gorman RW, Berrardinelli SP, Bender TR. Health hazard evaluation report. HETE 89-200 and 89-273-2111, Exxon/Valdez Alaska oil spill. Cincinnati: Hazard Evaluation and Technical Assistance Branch, NIOSH, US, Department of Health and Human Services, 1991.
56. Woodin MA, Hauser R, Liu Y, Smith TJ, Siegel PD, Lewis DM, Tollerud DJ, Christiani DC. Molecular markers of acute upper airway inflammation in workers exposed to fuel-oil ash. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(1):182-7.
57. Pérez-Cadahia B, Lafuente A, Cabaleiro T, Pasaro E, Mendez J, Laffon B. Initial study on the effects of Prestige oil on human health. *Environ Int* 2007;33(2):176-85.
58. Zock JP, Rodríguez-Trigo G, Pozo-Rodríguez F, Barbera JA, Bouso L, Torralba Y, Anto JM, Gomez FP, Fuster C, Vereá H. Prolonged respiratory symptoms in clean-up workers of the prestige oil spill. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(6):610-6.
59. Gómez FP, Rodríguez-Trigo G, Zock JP, Serrano A, Bouso L, Torralba Y, Vereá H, Fuster C, Pozo F, Barberà JA. Increased 8-isoprostane in exhaled breath

- condensate of fishermen participating in clean-up activities of the Prestige oil spill. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173 (Suppl):A481.
60. Rodríguez-Trigo G, Zock JP, Vereá H, Torralba Y, Bouso L, Gómez F, Fuster C, Pozo-Rodríguez F, Barberà JA. Long-term effects on bronchial reactivity, oxidative stress and respiratory symptoms in fishermen who participated in clean-up activities of the Prestige oil spill. *Eur Respir J* 2006;28 (suppl):689.
 61. Carrasco JM, Lope V, Perez-Gomez B, Aragonés N, Suarez B, Lopez-Abente G, Rodriguez-Artalejo F, Pollán M. Association between health information, use of protective devices and occurrence of acute health problems in the Prestige oil spill clean-up in Asturias and Cantabria (Spain): a cross-sectional study. *BMC Public Health* 2006;6:1.
 62. Rodríguez-Trigo G, Zock JP, Pozo-Rodríguez F, Gomez FP, Monyarch G, Bouso L, Coll MD, Vereá H, Anto JM, Fuster C, Barbera JA. Health changes in fishermen 2 years after clean-up of the Prestige oil spill. *Ann Intern Med* 2010;153(8):489-98.
 63. Gómez FP, Torralba Y, Rodríguez-Trigo G, Serrano-Molar A, Gay G, Zock JP. Compromiso inflamatorio y remodelado de las vías áreas en marineros que participaron en las tareas de limpieza del vertido de fuel del buque Prestige. *Arch Bronconeumol* 2007;43 (suppl):3.
 64. Zock JP, Rodríguez-Trigo G, Rodríguez-Rodríguez E, Espinosa A, Pozo-Rodríguez F, Gomez F, Fuster C, Castano-Vinyals G, Anto JM, Barbera JA. Persistent respiratory symptoms in clean-up workers 5 years after the Prestige oil spill. *Occup Environ Med* 2012;69(7):508-13.
 65. Louw SJ, Cowie HA, Seaton A. Epidemiologic studies of Scottish oil shale workers: II. Lung function in shale workers' pneumoconiosis. *Am J Ind Med* 1986;9(5):423-32.
 66. Hauser R, Elreedy S, Hoppin JA, Christiani DC. Airway obstruction in boilermakers exposed to fuel oil ash. A prospective investigation. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152(5 Pt 1):1478-84.
 67. Raabe GK, Collingwood KW, Wong O. An updated mortality study of workers at a petroleum refinery in Beaumont, Texas. *Am J Ind Med* 1998;33(1):61-81.
 68. Luo JC, Hsu KH, Shen WS. Pulmonary function abnormalities and airway irritation symptoms of metal fumes exposure on automobile spot welders. *Am J Ind Med* 2006;49(6):407-16.
 69. Singhal M, Khaliq F, Singhal S, Tandon OP. Pulmonary functions in petrol pump workers: a preliminary study. *Indian J Physiol Pharmacol* 2007;51(3):244-8.

70. Uzma N, Salar BM, Kumar BS, Aziz N, David MA, Reddy VD. Impact of organic solvents and environmental pollutants on the physiological function in petrol filling workers. *Int J Environ Res Public Health* 2008;5(3):139-46.
71. Goldstein BD, Osofsky HJ, Lichtveld MY. The Gulf oil spill. *N Engl J Med* 2011;364(14):1334-48.
72. Jernelov A. The threats from oil spills: now, then, and in the future. *Ambio* 2010;39(5-6):353-66.
73. Zock JP, Rodriguez-Trigo G, Pozo-Rodriguez F, Barbera JA. Health effects of oil spills: lessons from the Prestige. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(10):1094-6.
74. Nurmatov U, Tagieva N, Semple S, Devereux G, Sheikh A. Volatile organic compounds and risk of asthma and allergy: a systematic review and meta-analysis of observational and interventional studies. *Prim Care Respir J* 2013;22(1):PS9-15.
75. Laffon B, Fraga-Iriso R, Perez-Cadahia B, Mendez J. Genotoxicity associated to exposure to Prestige oil during autopsies and cleaning of oil-contaminated birds. *Food Chem Toxicol* 2006;44(10):1714-23.
76. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. The ARRIVE guidelines. Animal Research: Reporting In Vivo Experiments. Available at: <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>. Accessed
77. Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax* 1965;17(4):320-8.
78. Robbesom AA, Versteeg EM, Veerkamp JH, van Krieken JH, Bulten HJ, Smits HT, Willems LN, van Herwaarden CL, Dekhuijzen PN, van Kuppevelt TH. Morphological quantification of emphysema in small human lung specimens: comparison of methods and relation with clinical data. *Mod Pathol* 2003;16(1):1-7.
79. Parameswaran H, Majumdar A, Ito S, Alencar AM, Suki B. Quantitative characterization of airspace enlargement in emphysema. *J Appl Physiol* 2006;100(1):186-93.
80. Hsia CC, Hyde DM, Ochs M, Weibel ER. An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(4):394-418.
81. Aguilera F, Mendez J, Pasaro E, Laffon B. Review on the effects of exposure to spilled oils on human health. *J Appl Toxicol* 2010;30(4):291-301.

82. Levy BS, Nassetta WJ. The adverse health effects of oil spills: a review of the literature and a framework for medically evaluating exposed individuals. *Int J Occup Environ Health* 2011;17(2):161-7.
83. Pauluhn J. Comparative assessment of early acute lung injury in mice and rats exposed to 1,6-hexamethylene diisocyanate-polyisocyanate aerosols. *Toxicology* 2008;247(1):33-45.
84. Allen JE, Bischof RJ, Sucie Chang HY, Hirota JA, Hirst SJ, Inman MD, Mitzner W, Sutherland TE. Animal models of airway inflammation and airway smooth muscle remodelling in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2009;22(5):455-65.
85. Wiggs BR, Bosken C, Pare PD, James A, Hogg JC. A model of airway narrowing in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(6):1251-8.
86. Cheung D, Schot R, Zwinderman AH, Zagers H, Dijkman JH, Sterk PJ. Relationship between loss in parenchymal elastic recoil pressure and maximal airway narrowing in subjects with alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(1):135-40.
87. Koyama H, Nishimura K, Ikeda A, Sakai N, Mishima M, Izumi T. Influence of baseline airway calibre and pulmonary emphysema on bronchial responsiveness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 1996;90(6):323-8.
88. Yang SC, Lin BY. Comparison of airway hyperreactivity in chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Chang Gung Med J* 2010;33(5):515-23.
89. Verhoeven GT, Verbraak AF, Boere-van der Straat S, Hoogsteden HC, Bogaard JM. Influence of lung parenchymal destruction on the different indexes of the methacholine dose-response curve in COPD patients. *Chest* 2000;117(4):984-90.
90. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* 2006;7:53.
91. Morissette MC, Parent J, Milot J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: what we know and what we need to know. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2009;4:19-31.

Anexo 1

Protocolo técnica TUNEL

Unitat de Pneumologia Experimental - STANDARD OPERATING PROCEDURE

SOP Title: <i>In situ</i> TUNEL apoptosis detection: peroxidase staining on paraffin-embedded tissue sections		
Effective Date: 2011-01-07	Version # 000801.02	Page: 1 of 7

Table of Contents

1. Materials.....	2
2. Equipment.....	2
3. Preparation of reagents.....	3
4. Protocol.....	5
5. SOP historical file.....	7

Unitat de Pneumologia Experimental - STANDARD OPERATING PROCEDURE

SOP Title:

In situ TUNEL apoptosis detection: peroxidase staining on paraffin-embedded tissue sections

Effective Date:
2011-01-07

Version #
000801.02

Page:
2 of 7

1. Materials

- 1-Butanol
- Anti-digoxigenin-peroxidase (ApopTag[®] part #05)
- Centrifuge tubes, 50 ml
- Control slides (ApopTag[®] part #07 or custom controls)
- DAB dilution buffer (ApopTag[®] part #09)
- DAB substrate (ApopTag[®] part #08)
- ddH₂O
- Eppendorf tubes
- Equilibration buffer (ApopTag[®] part #01)
- Ethanol (3 recycling bottles for dehydration)
- Ethanol (4 recycling bottles for deparaffination)
- Filter paper
- Forceps
- Hydrogen peroxyde, 30% stock
- Methyl green
- Pasteur pipettes
- PBS
- Permount
- Plastic coverslips (ApopTag[®] part #06)
- Protein digesting enzyme (proteinase K)
- Reaction buffer (ApopTag[®] part #02)
- Stop buffer (ApopTag[®] part #04)
- Syringe filter 0.2 µm
- Syringe, 10 ml
- TdT enzyme (ApopTag[®] part #03)
- Xylene (3 recycling bottles for dehydration)
- Xylene (3 recycling bottles for deparaffination)

2. Equipment

- Coplin jar (40 ml, up to 10 slides)
- Diamond pen
- Fume hood
- Humid chamber
- Hydrophobic pen
- Incubator (37°C)
- Micropipette (100-1000 µL)
- Micropipette (10-100 µL)
- Microscope
- PH-meter
- Pipette tips (blue & yellow)
- Slide flat support
- Slide rack
- Staining dishes (300 ml, minimum 10)
- Timer

Unitat de Pneumologia Experimental - STANDARD OPERATING PROCEDURE

SOP Title: <i>In situ</i> TUNEL apoptosis detection: peroxidase staining on paraffin-embedded tissue sections		
Effective Date: 2011-01-07	Version # 000801.02	Page: 3 of 7

3. Preparation of reagents

3.1. Protein digesting enzyme (proteinase K):

A. Preparation of stock enzyme:

- Resuspend lyophilized enzyme in 1.25 mL of ddH₂O for a final concentration of 20 mg/ml.
- Prepare aliquots of 125 µL.
- From each of these aliquots (one at a time as needed) prepare and store 20 µL vials of 5 mg/ml enzyme (dilute the aliquot to 500 and prepare 25 vials of 20 µL).

B. Preparation of working enzyme:

- Thaw a 20 µL vial of 5 mg/ml enzyme and dilute it to 5 mL with PBS. This provides working enzyme enough to apply on more than 40 slides.

3.2. Working H₂O₂:

- Dilute 10-fold the 30% stock H₂O₂ with PBS (final concentration 3%).
- For a 40 ml coplin jar (8 slides): 4 ml of 30% H₂O₂ + 36 mL PBS.
- Prepare fresh prior to use.

3.3. Working TdT enzyme:

- The concentrated TdT enzyme must be diluted with reaction buffer prior to use.
- Mix in a ratio of 70% reaction buffer (ApopTag[®] part #02) to 30% enzyme (ApopTag[®] part #03). Do not let the enzyme stock warm up to room temperature (it does not freeze at -20°C, storage temperature).
- Estimated volume needed for lung sections: 50 µL/slide.
- For a 10-slide experiment: 280 µL Reaction buffer + 120 µL enzyme.
- Stable for 6 hours maximum on ice.

Unitat de Pneumologia Experimental - STANDARD OPERATING PROCEDURE

SOP Title: <i>In situ</i> TUNEL apoptosis detection: peroxidase staining on paraffin-embedded tissue sections		
Effective Date: 2011-01-07	Version # 000801.02	Page: 4 of 7

3.4. Working stop buffer:

- Dilution factor: 1/35 with ddH₂O.
- For a 40 ml coplin jar: 1.1 ml stop buffer (ApopTag[®] part #04) + 38.9 mL ddH₂O.
- Stable for up to a year at 4°C in glass or plastic container.

3.5. Working peroxidase substrate:

- Dilution ratio: 1 µL DAB substrate : 49 µL Dilution buffer
- For a 10-slide experiment: 392 µL Dilution buffer (ApopTag[®] part #09) + 8 µL DAB substrate (ApopTag[®] part #08)
- Store in the dark at room temperature until use. Stable for 7 days at room temperature or 14 days at 4°C.

3.6. Methyl green counterstain:

- 0.5% (w:v) methyl green in 0.1M sodium acetate:
 - A. Preparation of 0.1M sodium acetate, pH 4.0: Dissolve 1.36 g of sodium acetate (crystal, NaCH₃COO•3H₂O) in 80 mL of ddH₂O. Adjust pH to 4.0 with acetic acid. Add ddH₂O to a final volume of 100 mL.
 - B. Dissolve 0.5 g of methyl green in the sodium acetate solution and store at room temperature.
- Filter through a 0.2 filter prior to use.

Unitat de Pneumologia Experimental - STANDARD OPERATING PROCEDURE

SOP Title: <i>In situ</i> TUNEL apoptosis detection: peroxidase staining on paraffin-embedded tissue sections		
Effective Date: 2011-01-07	Version # 000801.02	Page: 5 of 7

4. Protocol

(Estimated time: 6 hours 30 min.)

1. Design experiments of 20 slides maximum including controls.

Do not heat in 60°C oven prior to xylene deparaffination.

2. Deparaffinize tissue sections (under fume hood):

- 2.1. Wash in xylene 5 min. x3 times.
- 2.2. Wash in 100% ethanol 5 min. x2 times.
- 2.3. Wash in 95% ethanol 3 min.
- 2.4. Wash in 70% ethanol 3 min.
- 2.5. Wash in PBS 5 min.

3. Mark tissue boundaries with diamond pen on the reverse of each slide and circle tissue boundaries with hydrophobic pen. Return to PBS.

4. Pretreat tissue:

- 4.1. Transfer slides to humid chamber.
- 4.2. Apply working protein digesting enzyme.
- 4.3. Incubate for 15 min. at 37°C.
- 4.4. Wash in two changes of ddH₂O for 2 min. each.

5. Quench endogenous peroxidase:

- 5.1. Immerse in 3% H₂O₂ for 5 min. in coplin jar (4 ml of 30% H₂O₂ + 36 mL of PBS).
- 5.2. Wash in PBS 5 min. x2 times.

6. Apply equilibration buffer:

- 6.1. One slide at a time, tap off excess liquid, dry around section and transfer to humid chamber.

Unitat de Pneumologia Experimental - STANDARD OPERATING PROCEDURE

SOP Title: <i>In situ</i> TUNEL apoptosis detection: peroxidase staining on paraffin-embedded tissue sections		
Effective Date: 2011-01-07	Version # 000801.02	Page: 6 of 7

6.2. Apply equilibration buffer (ApopTag[®] part #01) immediately and cover section with plastic coverslip.

6.3. Incubate at least for 10 sec. This is an optional stopping point (up to an hour at 4°C).

7. TdT enzyme reaction:

7.1. One slide at a time, tap off excess liquid and dry around section.

7.2. Apply working TdT enzyme immediately, except to negative control.

7.3. Cover section with plastic coverslip.

7.4. Incubate at 37°C for 1 hour.

7.5. Stop reaction by transferring the slides to a coplin jar containing working **stop buffer**.

7.6. Agitate for 15 sec. and incubate for 10 min. at room temperature. This is an optional stopping point: The slides can be stored in 70% ethanol at -20°C for 3 days or more.

7.7. Make at this point an aliquot of anti-digoxigenin peroxidase from the stock bottle (ApopTag[®] part #05), sufficient for the number of slides to be processed (400 µL for an 8-slide experiment). Let it equilibrate room temperature.

7.8. Wash the slides in PBS 1 min. x3 times.

8. Apply anti-digoxigenin conjugate:

8.1. One slide at a time, tap off excess liquid, dry around section and transfer to humid chamber.

8.2. Apply anti-digoxigenin peroxidase.

8.3. Cover section with plastic coverslip.

8.4. Incubate 30 min. at room temperature.

8.5. Wash in PBS 2 min. x4 times.

9. Development:

9.1. One slide at a time, tap off excess liquid, dry around section and transfer to humid chamber.

9.2. Apply working peroxidase substrate immediately.

Unitat de Pneumologia Experimental - STANDARD OPERATING PROCEDURE

SOP Title:

In situ TUNEL apoptosis detection: peroxidase staining on paraffin-embedded tissue sections

Effective Date:
2011-01-07

Version #
000801.02

Page:
7 of 7

9.3. Incubate while monitoring reaction under the microscope.

9.4. Stop reaction by immersing in ddH₂O and washing 1 min. x3 times.

9.5. Leave at least 5 min. in ddH₂O.

10. Methyl green counterstain (under fume hood):

10.1. Transfer slides to humid chamber. Tap off excess liquid and dry around section.

10.2. Apply methyl green on sections with a syringe using a 0.2 µm filter.

10.3. Incubate 10 min.

10.4. Transfer slides to a rack and dip 10 times into 2 washes of ddH₂O, followed by 30 seconds without agitation in a third wash (all washes in staining dishes).

10.5. Wash in 3 changes of 100% 1-butanol, dipping the rack 10 times in the first and second washes, followed by 30 seconds without agitation in the third wash.

11. Mount slides (under fume hood):

11.1. Dehydrate specimens by moving through 3 baths of xylene (skip the usual dehydration steps with ethanol, since the methyl green would destain).

11.2. Mount with Permount.

11.3. Leave on a flat surface for at least 24 hours before vertical storage.

5. SOP HISTORICAL FILE

Version No.	Effective Date	Section	Modification(s)/Revision(s)
01	2001-09-09	N/AP	Original version.
02	2011-01-07	N/AP	Revised version.