



TESIS DOCTORAL

La cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) como bioindicador de contaminación ambiental: uso de muestras no destructivas en la monitorización de la contaminación por metales

Ana Raquel do Espírito Santo Maia

Programa de Doctorado en Salud Pública y Animal

2021



TESIS DOCTORAL

La cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) como bioindicador de contaminación ambiental: uso de muestras no destructivas en la monitorización de la contaminación por metales

Ana Raquel do Espírito Santo Maia

Programa de Doctorado en Salud Pública y Animal

2021

Conformidad de los Directores:

La conformidad de los directores de la tesis consta en el original en papel de esta Tesis Doctoral

Dr. D. Francisco Soler Rodríguez

Dr. D. Marcos Pérez López

En memoria de
mi querido hermano, André

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los 12 elementos en estudio.	16
Tabla 2. Referencias bibliográficas de arsénico en sangre de cigüeña blanca.	32
Tabla 3. Referencias bibliográficas de cadmio en sangre de cigüeña blanca.	33
Tabla 4. Referencias bibliográficas de plomo en sangre de cigüeña blanca.	34
Tabla 5. Referencias bibliográficas de mercurio en sangre de cigüeña blanca.	35
Tabla 6. Referencias bibliográficas de selenio en sangre de cigüeña blanca.	35
Tabla 7. Referencias bibliográficas de cobalto en sangre de cigüeña blanca.	36
Tabla 8. Referencias bibliográficas de cobre en sangre de cigüeña blanca.	37
Tabla 9. Referencias bibliográficas de hierro en sangre de cigüeña blanca.	38
Tabla 10. Referencias bibliográficas de zinc en sangre de cigüeña blanca.	39
Tabla 11. Referencias bibliográficas de manganeso en sangre de cigüeña blanca.	40
Tabla 12. Principales enzimas plasmáticas en aves, su presencia en los tejidos, especificidad e interpretación.	42
Tabla 13. Estudios publicados con valores de enzimas, electrolitos, metabolitos y minerales en <i>Ciconia ciconia</i> , o en otras especies del género <i>Ciconia</i>	48
Tabla 14. Estadísticos principales de todas las variables estudiadas (media \pm DE, SEM, valor máximo y mínimo de las concentraciones [entre paréntesis: porcentaje de las muestras con valores $<$ LD], mediana y percentiles 25 % y 75 % obtenidos de la sangre de cigüeña blanca (n = 70).	73
Tabla 15. Estadísticos principales de todas las variables estudiadas (media \pm DE, mínimo, mediana, máximo) obtenidos a partir de la sangre de cigüeña blanca, según su edad (pollos n = 37; adultos n = 33)	74
Tabla 16. Estadísticos principales de las variables en estudio para los grupos: pollos machos, pollos hembras, adultos machos y adultos hembras.	75
Tabla 17. Valores «p» para la correlación de Spearman entre elementos hallados en sangre de cigüeña blanca, sin tener en cuenta edad y sexo.	77
Tabla 18. Valores de «p» para la correlación de Spearman en el grupo de adultos. En negrita valores de $p < 0,05$; (a): valores de $p < 0,001$	79
Tabla 19. Valores de «p» para la correlación de Spearman en el grupo de pollos. En negrita valores de $p < 0,05$; (a): valores de $p < 0,001$	80
Tabla 20. Distribución del número de muestras de sangre por año, lugar de muestreo y grupo de edad.	100
Tabla 21. Descriptivos de los parámetros sanguíneos en cigüeña blanca de forma global (total de ejemplares) y en función del grupo de edad. $X \pm DE = \text{Media} \pm$ Desviación estándar.	102
Tabla 22. Estudio estadístico multivariante sobre el efecto de la edad en la actividad de las enzimas plasmáticas.	103
Tabla 23. Resultados del estudio estadístico de correlaciones (r de Spearman y significación estadística) entre cada parámetro sanguíneo en función de la edad y del global de los ejemplares de cigüeña blanca. Se detallan las correlaciones significativas mediante colores (verde= $P < 0,05$; azul= $P < 0,01$ y rojo= $P < 0,001$)...	106

Tabla 24. Estadísticos descriptivos de los parámetros sanguíneos Δ -ALAD, hematocrito y hemoglobina en cigüeña blanca en función de los cuatro grupos de niveles de plomo en sangre. $X \pm DE = \text{Media} \pm \text{Desviación típica}$	108
Tabla 25. Estudio estadístico multivariante entre los parámetros sanguíneos plomo, Δ -ALAD, hematocrito y hemoglobina en cigüeña blanca en función de los cuatro grupos de niveles de plomo en sangre (ns: no significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).	108
Tabla 26. Estudio de regresión lineal entre la concentración de plomo y la actividad Δ -ALAD en distintos grupos de rangos de concentración de plomo expresado tanto en su dato normal ($\mu\text{g/L}$) como en su valor transformado logarítmicamente ($\log\text{-Pb}$).....	109
Tabla 27. Estudio estadístico (ANOVA con test de Tukey) entre grupos de rangos de concentración de plomo en función de la concentración de plomo y la actividad Δ -ALAD. Se indica el porcentaje de inhibición de la enzima respecto al grupo de menor concentración de plomo.	111
Tabla 28. Resultados del estudio estadístico de regresión lineal (valores de r^2 y significación estadística) entre el Pb (valor logarítmico) y la Δ -ALAD en función de la edad y del global de los ejemplares de cigüeña blanca. Se detallan las correlaciones significativas (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$).	113
Tabla 29. Valores estadísticos de los niveles de As, Cd, Hg y Pb en sangre de pollos de cigüeña blanca (<i>Ciconia ciconia</i>) en los años 1998-99 y 2008-09.	125
Tabla 30. Correlaciones entre las concentraciones sanguíneas de As, Hg y Pb en polluelos de cigüeña blanca, entre los años 1998/99 y 2008/09.....	126
Tabla 31. Tamaño muestral (n) y estadística descriptiva (media \pm desviación estándar y rango) para la actividad de las enzimas plasmáticas.	149
Tabla 32. Estudio estadístico multivariante sobre el efecto de la edad sobre los electrolitos plasmáticos	149
Tabla 33. Tamaño muestral (n) y estadística descriptiva (media \pm desviación estándar y rango) para los electrolitos. Datos en mmol/L.	150
Tabla 34. Estudio estadístico multivariante sobre el efecto de la edad sobre los electrolitos plasmáticos.	150
Tabla 35. Tamaño muestral (n) y estadística descriptiva (media \pm desviación estándar y rango) para los parámetros metabólicos del plasma.	151
Tabla 36. Estudio estadístico multivariante sobre el efecto de la edad en metabolitos plasmáticos y otros parámetros.....	152
Tabla 37. Estadística descriptiva para los parámetros bioquímicos en plasma en las tres colonias estudiadas (C, AG y Z). Se detallan las diferencias significativas tras el test de Kruskal-Wallis y el post hoc de Dunn.	158
Tabla 38. Estudio estadístico de correlaciones (valores de P) entre cada elemento químico (Cu, As, Hg y Pb) y cada parámetro bioquímico plasmático en función de cada colonia (C, AG y Z) y del conjunto global de pollos. Se detallan las correlaciones significativas mediante colores (verde= $P < 0,05$; azul= $P < 0,01$ y rojo= $P < 0,001$).....	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de la cigüeña blanca, adaptada de Seo-Birdlife (2020).	12
Figura 2. Distribución de colonias de <i>Ciconia ciconia</i> en Extremadura.....	13
Figura 3. Emisiones de metales pesados Cd, Hg, Pb entre 1990 y 2017.	20
Figura 4. Representación de los metales en los casos donde se hallaron diferencias con relevancia estadística tras las pruebas de Kruskal-Wallis y de Dunn: Cr (A), Se (B) y Pb (C). Grupos: M (machos); H (hembras), P (pollos); Ad (adultos). *p < 0,05; **p < 0,001.	76
Figura 5. Representación gráfica de la correlación positiva significativa para la totalidad de las 70 muestras de sangre entre los pares de metales Hg-As (a), Hg-Se (b) y Fe-Zn (c). El valor del coeficiente de Spearman en R se expresa en cada gráfico (p < 0,001).	78
Figura 6. Mapa de distribución de las colonias de cigüeña blanca (C, AG y Z) donde se tomaron las muestras de sangre de pollos (V=vertedero) e imagen de una de las tomas.....	99
Figura 7. Niveles de Δ -ALAD (A), hematocrito (B) y hemoglobina (C) en los cuatro grupos de rangos de niveles de plomo: Pb-1 (<50 $\mu\text{g/L}$), Pb-2 (>50 a <100 $\mu\text{g/L}$), Pb-3 (>100 a <200 $\mu\text{g/L}$) y Pb-4 (≥ 200 $\mu\text{g/L}$).	107
Figura 8. Correlaciones entre la actividad Δ -ALAD y el Pb en sangre de forma global (todos los datos) y en función de la edad con indicación de la correlación de Spearman (izquierda) y de la regresión lineal con el log-Pb (derecha).....	110
Figura 9. Representación gráfica de los niveles medios de As, Cd, Hg y Pb en sangre de pollos de cigüeña blanca (<i>Ciconia ciconia</i>) en los años 1998-99 y 2008-09. ...	125
Figura 10. Representación gráfica de las correlaciones entre los niveles medios de As, Cd, Hg y Pb en sangre de pollos de cigüeña blanca (<i>Ciconia ciconia</i>) en los años 1998-99 y 2008-09.....	127
Figura 11. Niveles de metales y As en las 3 colonias, indicando valores de mediana, mínimo y máximo: A- Cu. B-Pb, C-As. D-Hg y E-Cd y el resultado del estudio comparativo para cada elemento entre las colonias (test de Kruskal-Wallis y post hoc de Dunn: * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, **** p <0,0001).	157
Figura 12. Representación gráfica de las correlaciones más significativas (As-K y As-GGT) encontradas entre elementos químicos y parámetros bioquímicos plasmáticos usando el total de los pollos de las 3 colonias.	163

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	5
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
1. Contaminación ambiental y Ecotoxicología.....	8
1.1. Ecotoxicología y biomonitorización.....	8
2. La cigüeña blanca como bioindicador.....	11
2.1. Las aves como bioindicadores.....	11
2.2. La cigüeña blanca.....	11
3. Contaminación ambiental por metales y otros elementos.....	14
3.1. Metales: generalidades.....	15
3.1.1. Factores que afectan las concentraciones de metales en tejidos animales.....	17
3.1.2. Principales fuentes de contaminación metálica en aves.....	17
3.2. Elementos químicos tóxicos.....	18
3.2.1. Arsénico.....	18
3.2.2. Cadmio.....	19
3.2.3. Mercurio.....	21
3.2.4. Plomo.....	23
3.3. Elementos esenciales.....	26
3.3.1. Cobalto.....	26
3.3.2. Cobre.....	26
3.3.3. Cromo.....	27
3.3.4. Hierro.....	27
3.3.5. Níquel.....	28
3.3.6. Selenio.....	29
3.3.7. Zinc.....	29
3.3.8. Manganeseo.....	30
3.4. Elementos estudiados y concentraciones en sangre de cigüeña blanca.....	31
4 - Parámetros bioquímicos y hematológicos en cigüeña blanca.....	40
4.1. Bioquímica clínica.....	41
4.2. Enzimas más utilizadas en la bioquímica clínica de aves.....	41
4.3. Metabolitos.....	43
4.4. Proteínas totales y albúmina.....	45
4.5. Lípidos.....	45
4.6. Glucosa.....	46
4.7. Electrolitos.....	46
4.8. Minerales.....	46
4.9. Parámetros hematológicos (hematocrito y hemoglobina).....	47
5 - Referencias.....	49
OBJETIVOS.....	63

CAPÍTULO I. Concentración de 12 metales y metaloides en sangre de cigüeña blanca (<i>Ciconia ciconia</i>): valores basales e influencia de la edad y el sexo.....	65
Resumen.....	67
Abstract.....	67
I.1. Introducción.....	68
I.2. Materiales y métodos.....	70
I.3. Resultados.....	72
I.4. Discusión.....	80
I.5. Conclusiones.....	85
I.6. Agradecimientos.....	86
I.7. Referencias.....	86
CAPÍTULO II. Efecto del plomo en sangre sobre la actividad enzimática Δ -ALAD, el hematocrito y los niveles de hemoglobina en la cigüeña blanca (<i>Ciconia ciconia</i>).....	93
Resumen.....	95
Abstract.....	95
II.1. Introducción.....	96
II.2. Material y métodos.....	98
II.3. Resultados y discusión.....	102
II.4. Conclusiones.....	113
II.6. Referencias.....	114
CAPÍTULO III. La cigüeña blanca (<i>Ciconia ciconia</i>) como bioindicador de contaminación ambiental: tendencia temporal en los niveles en sangre de Pb, Cd, Hg y As entre 1998/1999 y 2008/2009.....	117
Resumen.....	119
Abstract.....	119
III.1. Introducción.....	120
III.2. Material y métodos.....	122
III.3. Resultados.....	124
III.4. Discusión.....	128
III.5. Conclusiones.....	132
III.6. Referencias.....	133
CAPÍTULO IV. Parámetros bioquímicos sanguíneos en cigüeña blanca y su relación con la concentración de elementos metálicos en sangre.....	141
Resumen.....	143
Abstract.....	143
IV.1. Introducción.....	144
IV.2. Material y métodos.....	145
IV.3. Resultados y discusión.....	147
IV.4. Conclusiones.....	164
IV.5. Referencias.....	164
DISCUSIÓN GENERAL.....	171
CONCLUSIONES GLOBALES.....	181

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría, a través de estas líneas, conseguir expresar mi sincero agradecimiento a todos los que tornaron realidad lo que parecía imposible en un determinado momento, la conclusión de esta tesis de doctorado.

Sí he logrado llegar al final de este largo camino es gracias a mis directores de tesis, los Profesores Drs. Francisco Soler Rodríguez y Marcos Pérez López. Tengo tanto que decir, en primer lugar, agradecer porque siempre me han facilitado todos los medios para proseguir el doctorado, estoy impresionada con vuestra capacidad de motivarme, con vuestra paciencia, grata por todo lo que he aprendido con vosotros. Paco, tu amplio conocimiento y sabiduría es una inspiración para quienes amamos la ciencia. Marcos, gracias por todo el conocimiento que has compartido conmigo y por todo el apoyo cuando mal me expresaba en ¡portuñol!.

A las Profesoras M^a Prado Míguez y Ana Oropesa y al Dr. David Hernández por todo su apoyo.

A todos los compañeros con quienes compartí el espacio y el tiempo en la Unidad de Toxicología, a Marta, a las Irenes, a Yolanda, a Javier, a Salomé y a muchos otros por el ánimo y el compañerismo dados.

La incansable Cari, sin la cual mi trabajo en el laboratorio de Toxicología no hubiera sido posible.

Dar las gracias a todos en el Departamento de Patología Clínica, del Hospital Veterinario de la Universidad de Extremadura, en primer lugar, al profesor Rafael Barrera Chacón, por haberme acogido tan bien, por su soporte en gran parte del trabajo laboratorial que allí realicé y por los conocimientos dados.

Al profesor José Luís Rodríguez, de la Unidad de Genética que me dejó participar en parte de los procedimientos de determinación genética del sexo.

A mis queridos amigos, en especial a Rita que aún en la distancia me dio siempre buenos consejos, me hizo reír y me contagió con su interés por la investigación y ciencia, a Anuka que siempre me ayudó cuando me perdía en el mundo del lenguaje y no solo, a Ticha por el cariño y preciosa ayuda con el inglés.

A mis compañeros felinos: Gordo y Viking, siempre presentes en la hora de estar delante del ordenador.

Y por último a quien todo debo, a mi familia, en especial a mis padres, a mi hermano y a mi madrina Cila que siempre creyeron en lo imposible. A João y a nuestras hijas, por poner a prueba todos mis límites y capacidades que me incentivaron a superarme.

A todos: gracias de corazón.

RESUMEN

El principal objetivo de este estudio fue investigar la utilidad de la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) como bioindicador de contaminación metálica, recurriendo para ello al uso de muestras no destructivas (sangre). Según este objetivo principal, se realizaron distintos estudios: el primero determinó a través de la técnica de ICP-MS los niveles sanguíneos de 12 metales (incluyendo el Ni y Cr, por primera vez cuantificados en cigüeña blanca) e investigó la influencia del sexo y de la edad en esos niveles. Un segundo estudio para comprobar si la cigüeña blanca podría ser útil para identificar tendencias temporales en la evolución de los niveles de polución metálica, comparando niveles de metales pesados y As durante un periodo de 10 años. Un tercer trabajo buscó verificar el valor predictivo del hematocrito, de la hemoglobina y del biomarcador actividad enzimática Δ -ALAD frente a la exposición al Pb de estos animales, siendo determinados los valores de estos parámetros y correlacionados con los niveles de Pb en sangre. Por último, se determinaron los valores de 19 parámetros bioquímicos (por ej. enzimas plasmáticas) en cigüeñas jóvenes y adultas, tanto hembras como machos, con el fin de obtener intervalos que permitan acceder a conocer mejor su estado de salud, y estudiando cómo éstos se correlacionan con los niveles sanguíneos de metales. Es de destacar que, además, fue también posible utilizar la sangre de cigüeña blanca para comparar a nivel espacial la contaminación metálica, al compararse los valores cuantificados en muestras provenientes de 3 hábitats distintos. A través de las concentraciones de metales pesados en sangre de cigüeña blanca se consiguió detectar una tendencia temporal, claramente decreciente en el periodo estudiado. Se encontró una correlación negativa significativa y fuerte entre log-Pb y Δ -ALAD, lo que revelaría que la Δ -ALAD es un biomarcador útil de la exposición a Pb en la cigüeña blanca. El sexo no tuvo influencias claras ni en las concentraciones sanguíneas de metales ni en los niveles de parámetros bioquímicos. Por el contrario, la edad sí se relacionó con diferencias estadísticas significativas en los niveles sanguíneos de varios metales y en muchos de los parámetros plasmáticos, siendo un factor a considerar en estudios futuros. A pesar de ello, no se pudieron extraer conclusiones sólidas sobre las relaciones encontradas entre algunos parámetros plasmáticos y los niveles de metales pesados, pudiéndose comprobar, eso sí, que la cigüeña blanca es un útil y sensible bioindicador de contaminación metálica.

Palabras clave: cigüeña blanca; metales; biomarcador; bioindicador.

ABSTRACT

The main objective of this study was to investigate the usefulness of the white stork (*Ciconia ciconia*) as a bioindicator of metallic contamination, using of non-destructive samples (blood). According to this main objective, different studies were carried out: the first, determined through the ICP-MS technique the blood levels of 12 metals (including Ni and Cr, for the first time quantified in the white stork) and investigated the influence of sex and age on these levels. A second study to verify if the white stork could be useful to identify temporal trends in the evolution of metal pollution levels, comparing levels of heavy metals and As over a period of 10 years. A third work sought to verify the predictive value of hematocrit, hemoglobin and the biomarker enzyme activity Δ -ALAD against Pb exposure of these animals, the values of these parameters being determined and correlated with Pb levels in blood. Finally, the values of 19 biochemical parameters (such as plasma enzymes) were determined in young and adult storks, both female and male, in order to obtain intervals that allow access to better know the state of health of the white stork, studying how these correlates with blood levels of metals. It is noteworthy that, in addition, it was also possible to use white stork blood to compare metallic contamination at a spatial level, by comparing the quantified values in samples from 3 different habitats. Through the concentrations of heavy metals in the blood of the white stork, it was possible to detect a temporal trend, clearly decreasing in the period studied. A significant and strong negative correlation was found between log-Pb and Δ -ALAD, which would reveal that Δ -ALAD is a useful biomarker of Pb exposure in the white stork. Gender had no clear influence on blood metal concentrations or levels of biochemical parameters. On the contrary, age was related to statistically significant differences in the blood levels of various metals and in many of the plasma parameters, being a factor to be considered in future studies. Despite this, no solid conclusions could be drawn on the relationships found between some plasma parameters and heavy metal levels, but it was possible to verify, however, that the white stork is a useful and sensitive bioindicator of metallic contamination.

Keywords: white stork, metals, biomarker; bioindicator.

ESTRUCTURA DE LA TESIS

La presente tesis doctoral está dividida en distintos apartados que reflejan los objetivos y tareas acometidas para conseguirlos. La estructura es de 7 grandes bloques generales: una Introducción general, los Objetivos (generales y específicos), cuatro Capítulos (que componen el cuerpo de la tesis y que se corresponden con cada uno de los objetivos específicos marcados), una Discusión General que engloba los resultados de todos los capítulos, y finalmente las Conclusiones que hemos podido obtener en todo el estudio.

En la *Introducción general* se abordan los asuntos y la base teórica que podrán ser útiles a la comprensión de los capítulos experimentales, mediante la realización de una revisión bibliográfica actualizada en torno a los distintos asuntos que nos interesan. Así, hay una introducción sobre la contaminación ambiental y la Ecotoxicología, seguida de los conocimientos actuales sobre la utilidad de la cigüeña blanca como una especie bioindicadora de la contaminación ambiental. El grupo de contaminantes a estudiar en esta tesis es el de los elementos químicos inorgánicos, por lo que a continuación se tratan los distintos elementos de interés, en particular los denominados metales pesados, su toxicidad y sus efectos y cinética en las aves. Finalmente, se tratan algunos parámetros de salud y enzimas que son importantes para evaluar el bienestar y salud de estos animales, así como detectar algunas alteraciones provocadas por los contaminantes ambientales. El estudio de esos parámetros, también denominados como biomarcadores de salud y de contaminación, es útil para la conservación de la especie y para el trabajo que se propone esta tesis, la biomonitorización de la contaminación ambiental por metales.

A continuación, aparece el apartado de *Objetivos*, en el que se definen los objetivos generales que se persiguen en esta tesis, así como los objetivos específicos que son semejantes a los propuestos en cada uno de los trabajos desarrollados en el siguiente apartado de Capítulos.

El cuerpo de la tesis está compuesto por 4 *Capítulos* que se organizan con un formato típico de un artículo científico, un capítulo ya publicado y otros tres que se pretenden publicar.

Aunque en cada uno de los capítulos se haga una discusión concreta, reflejando los principales resultados, en la *Discusión general* se hace un resumen como una perspectiva global de las distintas discusiones.

Por último, en las *Conclusiones globales* se hace una evaluación de los objetivos propuestos, de las principales cuestiones abordadas y de nuevas perspectivas para la utilización de la cigüeña blanca como bioindicador.



INTRODUCCIÓN GENERAL



Nido de *Ciconia ciconia* en el Campus Universitario de Cáceres, Universidad de Extremadura, España. Foto propia.



1. Contaminación ambiental y Ecotoxicología

En la actualidad, la preocupación por la contaminación ambiental es compartida por la comunidad científica y la sociedad en general. Día a día el número de sustancias peligrosas y tóxicas, liberadas debido a la intensa actividad humana, aumenta de forma exponencial. Dentro de esas sustancias contamos con contaminantes orgánicos persistentes y elementos químicos (generalmente metales) que son responsables de una gran variedad de efectos nocivos en los ecosistemas y en la salud, tanto de los animales como del ser humano (Carneiro *et al.*, 2014; Melancon, 2003). Además, los metales y algunos compuestos orgánicos sintéticos pueden lograr una distribución verdaderamente global debido al transporte atmosférico y deposición en los suelos y en la superficie del agua (Hoffman *et al.*, 2003), llegando hasta las áreas del planeta más remotas como la Antártida. La entrada de estos contaminantes en el organismo animal suele ser debida a la exposición por vía aérea u oral a través de la ingestión de alimentos contaminados. Por ello, los lugares donde estén establecidos y la presencia en ellos de diversas actividades potencialmente contaminantes (agrícolas, industriales, urbanas...) condicionan la carga corporal de estos compuestos químicos. La actividad agrícola se asocia fundamentalmente con contaminación por compuestos orgánicos (plaguicidas) y la actividad industrial a compuestos metálicos y otros orgánicos como los PCBs, PBDEs, PAHs etc. Como consecuencia de la actividad urbana se generan a diario grandes cantidades de residuos sólidos que son eliminados en vertederos. A ellos acuden a diario una gran cantidad de animales, principalmente aves, en busca de alimento fácilmente disponible, aunque también los vertederos actúan como fuente de contaminación (Plaza y Lambertucci, 2018).

1.1. Ecotoxicología y biomonitorización

La Toxicología es la ciencia que estudia los efectos adversos de las sustancias físicas y químicas (como los metales) en los organismos vivos (Gilbert, 2012). El estudio y la evaluación de los efectos de las sustancias tóxicas en los ecosistemas, con el objetivo de predecir los mismos y proteger los ecosistemas de una manera global, son objetivos principales de la Ecotoxicología (Hoffman *et al.*, 2003). En Ecotoxicología se pueden determinar los contaminantes directamente en el aire, agua, suelo y seres vivos, lo que puede ser complejo, pues hay que manejar muchas muestras diferentes, siendo poco practicable y, además, puede ser lento y caro (Melancon, 2003). Existen otras formas de monitoreo ambiental, dirigidas a la medición de las concentraciones tisulares de los contaminantes en determinados organismos vivos. Para tener información sobre los peligros asociados a los contaminantes, la Ecotoxicología ha recurrido así a una herramienta, basada en la observación cualitativa y/o cuantitativa de los niveles y efectos causados por los agentes químicos en los organismos vivos (DeCaprio, 2006; Fossi, 1994; Lagadic *et al.*, 1998), la **biomonitorización**. La biomonitorización (así denominada por trabajar con seres vivos, o bioindicadores), proporciona información acerca de las relaciones entre las condiciones ambientales y los seres vivos, incluyendo distintos componentes (Burger y Gochfeld, 2001; Burger *et al.*, 2007) como son: 1) el análisis de



las concentraciones tisulares del agente químico en el bioindicador, 2) valoración de la salud y los efectos en las poblaciones estudiadas y en sus depredadores, y 3) estudio de la tendencia espacial o temporal de los niveles de contaminantes. En estos estudios de biomonitorización utilizaremos **bioindicadores**, que son organismos vivos que por sus características ecológicas presentan una elevada sensibilidad a los cambios ambientales (contaminantes) y reaccionan ante ellos como si fueran estímulos específicos, y cuya acumulación de contaminantes traza se manifiesta mucho antes que en muestras abióticas (Beeby, 2001; Spahn y Sherry, 1999). El uso de una especie bioindicadora para determinar contaminantes junto con el análisis de la información existente de concentraciones y efectos ecológicos de esos contaminantes permite estudiar la evolución de las concentraciones e investigar si las medidas ambientales y normas legales son adecuadas o deben ser modificadas. Además, la presencia o detección de un contaminante en el ambiente no implica que un organismo interactúe necesariamente con él, por eso es también interesante la utilización de estas especies bioindicadoras (Levengood y Beasley, 2007; Reif, 2011). En el caso concreto de los bioindicadores de contaminación, las especies potenciales deben reflejar los niveles de contaminación del medio ambiente y variar de acuerdo con ellos (Cotín, 2012). Cualquier especie que sea empleada como bioindicadora ha de poseer las siguientes características (Becker, 2003; Furness, 1993; Muñoz-Arnanz, 2013):

- debe ser típico del ecosistema estudiado;
- debe ser ubicuo y abundante;
- con una amplitud de tolerancia reducida respecto a uno o más factores ambientales;
- debe ser capaz de sobrevivir a altas concentraciones de diferentes sustancias tóxicas;
- debe tener un tamaño, biotipo y comportamiento que faciliten el muestreo;
- debe tener un ciclo biológico y una ecología ya bien estudiados;
- debe ser capaz de bioconcentrar sustancias xenobióticas a un nivel tal que se pueda realizar un análisis directo sin la necesidad de preconcentrar.

Muy pocas especies cumplen todos y cada uno de estos requisitos, por lo que, al final, se hace necesario escoger aquellas especies que al menos reúnan el mayor número posible de los requisitos antes mencionados.

Otro elemento importante en la biomonitorización es el uso de **biomarcadores**, definidos como una alteración en los componentes, procesos celulares o bioquímicos, estructuras o funciones (por ejemplo, modificaciones en el comportamiento) inducida por xenobióticos y que es capaz de ser medido en un sistema biológico o muestra (Lagadic *et al.*, 1998; Melancon, 2003). Un biomarcador ideal debe (DeCaprio, 2006; Gil y Pla, 2001):

- ser específico para un tipo particular de exposición (indicar la exposición o efecto de un contaminante en particular);
- exhibir sensibilidad (permitir detectar un contaminante o xenobiótico incluso a niveles bajos);



- su uso tiene que ser éticamente aceptable y la toma de muestras, en conjunto con el análisis, ser fiable y sencilla;
- permitir la detección precoz y ser capaz de mostrar los efectos adversos de un xenobiótico antes de que sean irreversibles;
- ser reproducible (su aplicación como bioindicador debe poder ser reproducida temporalmente y entre laboratorios).

Existen varias clasificaciones de biomarcadores toxicológicos. En general, se clasifican en tres tipos: biomarcadores de exposición, biomarcadores de efecto, y biomarcadores de susceptibilidad (DeCaprio, 2006; Gil y Pla, 2001). Los **biomarcadores de susceptibilidad** sirven como indicadores de una particular sensibilidad de los individuos al efecto de un xenobiótico, pueden ser marcadores genéticos como las alteraciones que afectan la estructura cromosómica, como ejemplo la alteración de la actividad enzimática cuando hay un polimorfismo genético en una enzima (Gil y Pla, 2001).

Los **biomarcadores de exposición** son aquéllos que tan solo nos revelan la problemática del hecho propio de la exposición, como por ejemplo la medición de los niveles del xenobiótico en los diferentes tejidos o fluidos (Gil y Pla, 2001).

Los **biomarcadores de efecto** son los que se modifican o demuestran una alteración fisiológica como consecuencia de la exposición a un xenobiótico (Bernard, 2008). La mayoría de los biomarcadores de efecto está influenciada por diversos factores como: la edad; el sexo; la condición corporal y otros, como ejemplo enfermedades no relacionadas con la exposición al contaminante (Bernard, 2008). Entre los distintos biomarcadores de efecto o respuesta, en esta tesis doctoral se ha estudiado en sangre la actividad enzimática ácido delta-aminolevulínico deshidratasa (Δ -ALAD) cuya disminución en sangre es considerada como uno de los principales marcadores de efecto y exposición a plomo (Scheuhammer y Wilson, 1990). Detalles más amplios y concretos sobre este biomarcador específico de exposición a plomo serán tratados en el apartado “3.2.4.3. Toxicidad del plomo en aves”.

Esta metodología de biomonitorización con biomarcadores requiere la toma de muestras de organismos vivos, siendo siempre preferible (por cuestiones éticas fundamentalmente, y de conservación de especies, sobre todo si las especies están en peligro) el uso de muestras que no dañen significativamente o supongan la muerte del animal, como sucedería si utilizamos muestras como hígado, riñón o hueso, por ejemplo. Surgen así los denominados biomarcadores “no destructivos”, constituidos básicamente por tejidos (muestras) biológicos prescindibles en parte para el animal y que no implican la muerte o peligro para los animales (Fossi, 1994). En el caso de las aves estos tejidos se refieren sobre todo a sangre y plumas, y en menor medida las heces. Además, el empleo de biomarcadores “no destructivos” aporta una serie de importantes ventajas, entre las que destacamos las siguientes (Fossi, 1994): 1) permite analizar especies de gran relevancia ecológica o con un número reducido de efectivos, sin afectar a la especie de estudio (minimizar el estrés para la población); 2) posibilidad de realizar sucesivas biomonitorizaciones en las mismas poblaciones e individuos (si puede ser recapturado); y 3) mayor facilidad de muestreo, transporte y almacenamiento de las muestras.



En los estudios de campo el tejido más generalmente utilizado para la biomonitorización no destructiva es la sangre (Benito *et al.*, 1999; Blázquez *et al.*, 2006; García-Fernández *et al.*, 1996; Kamiński *et al.*, 2007, 2009; Kurhalyuk *et al.*, 2006; Martínez-López *et al.*, 2004; Pastor *et al.*, 2001). También en aves se pueden utilizar los huevos (Gómara *et al.*, 2008), aunque se deben utilizar los no viables, que tiene el inconveniente de que las concentraciones de contaminantes puedan cambiar debido a la degradación microbiana de los contaminantes orgánicos tras el periodo de incubación (Herzke *et al.*, 2002). La pluma es otra posibilidad de muestreo, y ha sido utilizada intensamente como muestra no destructiva de contaminación por metales pesados (Bianchi *et al.*, 2008; Burger, 1993; Martínez-López *et al.*, 2004), donde ha mostrado su utilidad.

En la literatura los términos bioindicador y biomarcador son a menudo aplicados como sinónimos, siendo las especies bioindicadoras más sensibles también llamadas “centinela”. En esta tesis doctoral utilizaremos bioindicador para definir a un organismo útil por sus características específicas en el estudio de uno o más contaminantes, y biomarcador para referirnos a una “respuesta” específica a una o más sustancias químicas, sea una respuesta molecular, comportamental o de otro tipo, pero siempre medible.

2. La cigüeña blanca como bioindicador

2.1. Las aves como bioindicadores

Las aves han sido usadas en diversos estudios de contaminación ambiental, porque son normalmente sencillas de observar, son un grupo de animales bien estudiados y son indicadores relativamente sensibles en la respuesta fisiológica a las alteraciones ambientales (Becker, 2003; Furness, 1993; Greenwood, 2004). La entrada de contaminantes en las aves les puede suponer problemas menos evidentes como alteraciones hepáticas, renales, comportamentales, alteraciones reproductivas (caso conocido del adelgazamiento de la cáscara del huevo por el diclorodifenildicloroetileno o DDE) (DeCaprio, 2006), modificaciones en el equilibrio endocrino y otros (Smith *et al.*, 2007), hasta la propia muerte.

2.2. La cigüeña blanca

La cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) pertenece a clase de las Aves, al orden Ciconiiformes, familia Ciconiidae (IUCN, 2017). Es un ave gregaria, se alimenta en pequeños grupos y anida en colonias (Van den Bossche *et al.*, 2002). Es un ave monógama y su época de reproducción en la Península ibérica se verifica entre marzo y abril, con una única puesta anual, siendo la incubación realizada por el macho y la hembra en conjunto (Batista, 2012; Van den Bossche *et al.*, 2002), y habitualmente el nido es reutilizado todos los años por la misma pareja (**Figura 1**). Es una especie altricial (que presupone escaso desarrollo de las crías al nacimiento) lo que se traduce en la dependencia total de los pollos recién nacidos y jóvenes en relación con la alimentación hecha por los progenitores (de la Casa-Resino *et al.*, 2014).



Especie: *Ciconia ciconia*
Orden Ciconiiformes; familia Ciconiidae

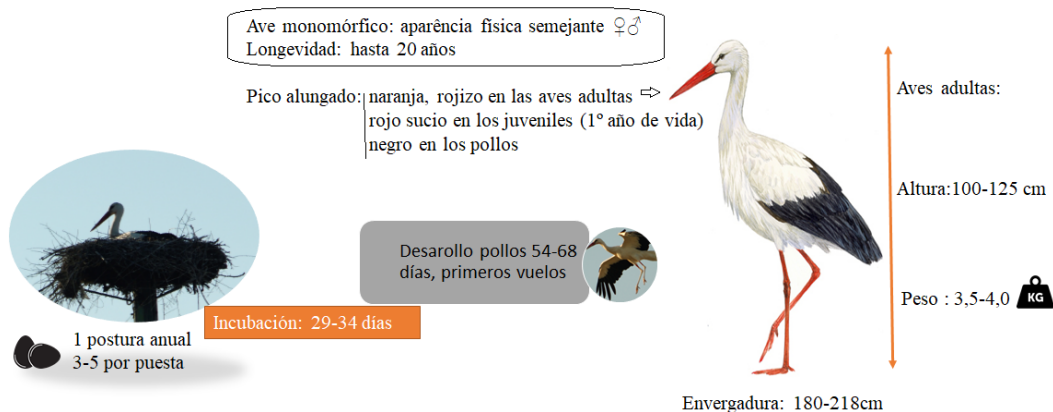


Figura 1. Características de la cigüeña blanca, adaptada de Seo-Birdlife (2020).

Los pollos de cigüeña blanca se desarrollan en unos 54-68 días, son independientes al cabo de los tres meses, recibiendo durante ese tiempo alimento recogido por los progenitores en los alrededores del nido (Kaminsky *et al.*, 2014). Por ello, su carga contaminante estará directamente relacionada con la contaminación general del entorno del nido ya que se alimentan tanto en sustrato acuático (ranas, crustáceos, peces) como terrestre (pequeños mamíferos, insectos, gusanos; lagartijas, culebras, lombrices de tierra) (Batista, 2012; IUCN, 2017), siendo muy interesante las colonias que se alimentan mayoritariamente en los basureros. La vía de exposición más frecuente a los metaloides, metales y metales pesados es la digestiva (Binkowski y Sawicka-Kapusta, 2015; Ramírez, 2011); de ahí la importancia de la alimentación en los estudios de contaminación ambiental en que se utilizan especies bioindicadoras.

La cigüeña blanca es un ave cuyas poblaciones están en incremento en Europa. Así pasó de *especie casi amenazada* en 1988 (clasificación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, IUCN en las siglas en inglés) a *especie de preocupación menor*, en el momento del desarrollo de esta tesis (IUCN, 2017). La Península Ibérica, junto con Polonia y Ucrania, alberga una de las poblaciones más importantes de cigüeña blanca de Europa, tanto de individuos invernantes como residentes. Extremadura alcanza una de las mayores densidades de población dentro de Europa (**Figura 2**), es la segunda comunidad más importante numéricamente de toda a España, siendo Cáceres y Badajoz, las provincias con mayor población absoluta (Molina y del Moral, 2005).

En la actualidad, muchas de estas aves no migran y residen todo el año en el mismo hábitat (poblaciones residentes), lo que es sobre todo evidente en las poblaciones ligadas a la alimentación en los basureros, lo que ha hecho que no inicien la migración a África tras la época de cría y algunas permanezcan en la zona de cría alimentándose básicamente en estos vertederos permanentes (Kruszyk y Ciach, 2010; Martínez, 1995).

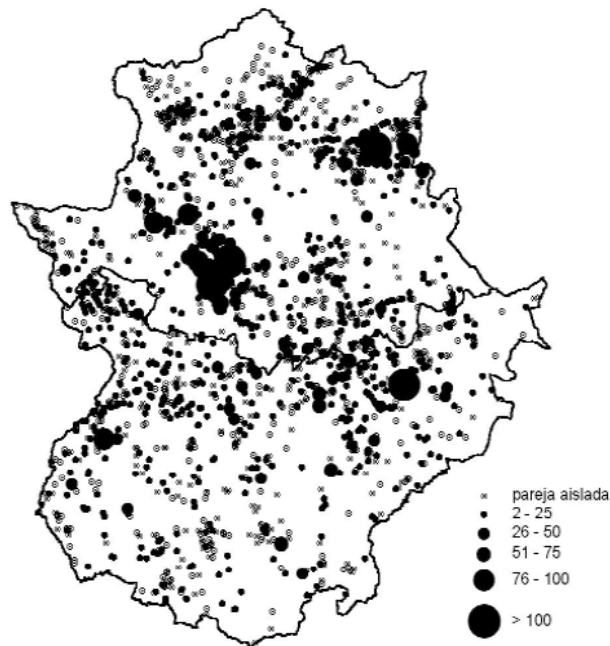


Figura 2. Distribución de colonias de *Ciconia ciconia* en Extremadura (Molina y del Moral, 2005).

La cigüeña blanca es una especie que *a priori* presenta una serie de ventajas para ser usada como bioindicador:

- es un ave longeva (vida media de entre 15-20 años),
- representatividad espacial: España alberga una de las poblaciones más importantes de cigüeña blanca de Europa con un aumento muy importante de las poblaciones, tanto de la temporal como de la invernante, en las dos últimas décadas; más de 33000 parejas reproductoras, doblando la población existente diez años atrás (Molina y del Moral, 2005),
- representatividad ecológica: es un ave muy representativa del ecosistema de la Península Ibérica donde tiene lugar su reproducción. Sus poblaciones están asociadas a la presencia de los ríos y sus vegas, los basureros, los arrozales, la agricultura y ganadería extensiva,
- al ser una especie altricial, la carga contaminante en los tejidos de pollos de cigüeña se relaciona directamente con la contaminación en el entorno del nido,
- la toma de muestras (sangre, plumas, huevos) es perfectamente reproducible en otros lugares y tiempos lo que posibilita la comparación de resultados,
- la localización y acceso a los nidos de cigüeña, principalmente en Extremadura, es relativamente fácil y nuestro grupo tiene localizadas perfectamente diversas colonias en las labores de anillamiento de años anteriores, estando relativamente cerca de nuestra ubicación física (magnífica disponibilidad de muestras),
- y es un ave que vuelve a compartir espacio con el hombre, estando numerosas colonias situadas directamente en el entorno urbano, e incluso está ligada a sus



actividades productivas ocupando espacios ganaderos (pastizales, dehesas) y también agrícolas (cultivos de secano y regadíos donde obtiene su alimento de las charcas y humedales) con exposición a plaguicidas actuales o persistentes utilizados antes de su prohibición, siendo cada vez más frecuente su presencia en los basureros (clara actividad antropogénica urbana).

La utilización de muestras no destructivas de cigüeña, como la sangre o las plumas, tiene una serie de ventajas: es posible repetir en algunos casos la recogida de muestras de un mismo individuo; se puede recoger un número de muestras significativo de una población sin amenazarla; no hay interferencia con los índices reproductivos; puede investigarse la concentración de un contaminante en relación con su tasa de crecimiento; evaluar la presencia media de contaminantes y el éxito reproductivo de una colonia (Becker, 2003; Spahny Sherry, 1999).

A pesar de estas posibilidades, la cigüeña había pasado prácticamente desapercibida en los estudios de biomonitorización. Sin embargo, el muestreo de su sangre se considera un elemento interesante en la biomonitorización de la contaminación por metales y por compuestos orgánicos clorados (Blázquez *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2000). A raíz del accidente del vertido de los residuos mineros de Aznalcóllar en 1998, la cigüeña ha sido una de las especies monitorizadas analizando los niveles de metales en sangre (Baos *et al.*, 2006a, 2006b, 2006c; Benito *et al.*, 1999, 1999; Meharg *et al.*, 2002; Pastor *et al.*, 2001). En Grecia se han estudiado los niveles en plumas de pollos de cigüeñas en relación a la edad, tamaño y orden de eclosión (Goutner *et al.*, 2011).

3. Contaminación ambiental por metales y otros elementos

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente ya que son sustancias químicas naturales ubicuas, la mayoría presente en la corteza terrestre. Son distribuidos en el medio ambiente por ciclos geológicos y biológicos. La lixiviación de los suelos, la meteorización de las rocas o las erupciones volcánicas son procesos naturales que pueden lograr a que los metales queden disponibles en la biosfera (Liu *et al.*, 2010; Ramírez, 2011). Sin embargo, la acumulación de los metales en los ecosistemas se debe principalmente a distintas actividades antropogénicas, como la extracción de recursos minerales, sobre todo de menas metálicas (Serrato *et al.*, 2010), la agricultura intensiva, el procesado y la quema de combustibles fósiles, la quema de residuos urbanos, distintos procesos industriales, emisiones urbanas y de vehículos (Beck *et al.*, 2014). Algunos metales forman parte de las “toxinas” descritas desde hace más tiempo por el hombre (Goyer y Clarkson, 1996). Como ejemplo, el plomo es utilizado desde hace más de 2000 años antes de Cristo, así como el arsénico y el mercurio que son empleados por el hombre desde 300 años antes de Cristo; y como sabemos algunos períodos históricos de la humanidad se identifican de acuerdo con los metales que eran más importantes (Goyer y Clarkson, 1996; Sacristán, 2012). Las actividades del hombre influyen en los niveles de metales en el aire, suelo, agua, y alimentos. Los metales son compuestos no biodegradables, además el hombre en su utilización ha alterado la composición química



y bioquímica de algunos elementos y, por lo tanto, su potencial tóxico (Liu *et al.*, 2010). La contaminación ambiental con metales, a pesar de las muchas medidas adoptadas para monitorizar, controlar y limitar la utilización de algunos, sigue teniendo un impacto negativo en la fauna y flora, es un riesgo para la Salud pública y es un tema muy importante que justifica los actuales estudios de biomonitorización de metales.

3.1. Metales: generalidades

Los metales pueden ser definidos en función de las propiedades fisicoquímicas del elemento en el estado sólido (con excepción del mercurio que es líquido a temperatura ambiente). Son propiedades típicas de los metales: la ductilidad mecánica, la resistencia frente a fuerzas de tracción, el brillo, la alta conductividad eléctrica y térmica, alta densidad y maleabilidad (Liu *et al.*, 2010). Desde el punto de vista de la Toxicología, es importante la capacidad de reacción de los metales en los sistemas biológicos por la pérdida de uno o más electrones y cationes, y su contribución o no en funciones biológicas (Levengood y Beasley, 2007; Liu *et al.*, 2010). El cadmio (Cd), el plomo (Pb) y el mercurio (Hg), son denominados metales pesados por sus altos pesos atómicos (mayores que 55,85 g/mol) y principalmente porque no tienen ninguna función biológica conocida y pueden provocar efectos tóxicos a bajas concentraciones (Burger, 2008; Serrato *et al.*, 2010). El arsénico (As) aunque no es un metal pesado, pero si un metaloide, con fines toxicológicos es abordado en conjunto con los anteriores por su elevada toxicidad tanto para humanos como para animales. Otros elementos inorgánicos metálicos como el cobre (Cu), el cobalto (Co), el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el níquel (Ni), el zinc (Zn) y el no metal selenio (Se) intervienen en varios procesos celulares, su concentración en el animal es habitualmente constante, su deficiencia en el organismo lleva a anomalías (fisiológicas u otras) y, por lo tanto, son considerados elementos esenciales para la vida (Benito *et al.*, 1999; Lucia *et al.*, 2010; Orłowski *et al.*, 2012). En la **Tabla 1** se presentan algunas características de los doce elementos en estudio en esta tesis.

En dosis elevadas y/o exposiciones prolongadas, los elementos esenciales pueden ser tóxicos (Levengood y Beasley, 2007; Liu *et al.*, 2010; Lucia *et al.*, 2010), provocando disminución del éxito reproductivo, daños en el ADN, carcinogénesis (Baos *et al.*, 2006b, 2012), liberación de glucocorticoides inducida por estrés (Beck *et al.*, 2014), entre otros efectos negativos. Por medio de distintos mecanismos, a veces elementos esenciales y metales pesados comparten efectos adversos; por ejemplo, Zn, Cd, Cu, Pb y Fe tienen, todos, la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (Liu *et al.*, 2010). Las ROS en bajas cantidades son esenciales en algunos procesos bioquímicos (Kurhalyuk *et al.*, 2006b); sin embargo, si la cantidad de ROS producida excede la capacidad antioxidante del organismo se produce estrés oxidativo, lo que explica algunos de los efectos tóxicos de ciertos elementos metálicos, como la capacidad de producir daños en el ADN (Cotín, 2012; Ramírez, 2011).

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los 12 elementos en estudio.

Símbolo químico	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Hg	Pb	As	Se
Clasificación a nivel químico	Metales											
Clasificación a nivel fisiológico	Elementos esenciales						Tóxicos					
Grupo del sistema periódico	(VI b)	(VII b)	(VIII b)	(VIII b)	(VIII b)	(I b)	(II b)	(II b)	(II b)	(IV a)	(V a)	(VI a)
Nº atómico	24	25	26	27	28	29	30	48	80	82	33	34
Peso atómico (u)	52,0	54,9	55,8	58,9	58,7	63,5	65,4	112,4	200,6	207,5	74,922	79,0
Punto fusión (°C)	1857,0	1246,0	1535,0	1495,0	1455,0	1083,0	420,0	320,9	-38,4	327,5	862,0	221,0
Punto ebullición (°C)	2672,0	2061,0	2750,0	2927,0	2457,0	2567,0	907,0	765,0	357,0	1740,0	614,0	685,0



La gran mayoría de los elementos anteriormente citados presentan características que llevan a que su toxicidad pueda ser “ampliada”, por tres procesos distintos, según Hamilton y Hoffman (2003):

- (1) bioacumulación (ocurre cuando los animales o plantas absorben las sustancias químicas del ambiente y/o de la dieta y al final presentan mayores concentraciones de estas sustancias en sus tejidos, en comparación con la concentración en el ambiente entorno o en la dieta),
- (2) bioconcentración (se refiere a la acumulación de contaminantes a partir del agua en los organismos acuáticos),
- (3) biomagnificación (cuando una sustancia química pasa para el nivel trófico superior y aumenta su nivel de residuos a cada nivel de la cadena alimentaria).

Así, muchos de los contaminantes metálicos liberados en el ambiente tienen una vida media larga (Blanco *et al.*, 2003; Levengood y Beasley, 2007) y su persistencia puede aumentar los efectos nefastos a nivel ambiental, ecológico y en los animales.

3.1.1. Factores que afectan las concentraciones de metales en tejidos animales

Las concentraciones de metales en sangre y otros tejidos (como hígado, riñón, plumas, hueso), pueden ser influenciados por distintos factores como la dosis a que está expuesto el animal, la vía de exposición, la duración y la frecuencia de exposición. Se pueden aún considerar:

(1) factores ajenos a los animales, como el nivel de contaminación del hábitat (Blanco *et al.*, 2003; Wayland *et al.*, 2007), el nivel de contaminación de la dieta y la estación del año (Fedynich *et al.*, 2007); (2) factores intrínsecos a los individuos (Burger, 2008) como la especie (Buekers *et al.*, 2009; Franson, 1996; Gómez *et al.*, 2004), la condición corporal, el estado reproductivo, la edad (Álvarez *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2011; Honda *et al.*, 1986; Lucia *et al.*, 2010; Scheuhammer, 1987), el sexo (Baos *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2011; Fisher *et al.*, 2006) y el nivel trófico (Cotín, 2012). En aves silvestres, como es el caso de la cigüeña blanca, hay que tener también en cuenta que dietas inadecuadas, baja condición corporal, hambre, factores ambientales y exposición a varios metales en simultáneo, pueden hacer que estas sean más susceptibles a intoxicaciones o que presenten niveles elevados de distintos metales simultáneamente (Franson, 1996). Los hábitos alimenticios de cada especie también contribuyen al potencial de exposición por ingestión de alimentos; en los depredadores son frecuentes los casos de envenenamiento secundario, ya que las presas afectadas por la toxicidad pueden ser más fáciles de capturar y esto atrae a los depredadores a zonas contaminadas (Kendall *et al.*, 2001).

3.1.2. Principales fuentes de contaminación metálica en aves

Las aves están expuestas a los metales por inhalación, contacto dérmico, pero principalmente a través de la dieta, siendo los niveles de metales presentes en los tejidos del ave relacionados principalmente con su concentración en los alimentos (DeCaprio, 2006; Gil y Pla, 2001). Como ejemplo, las lombrices y otros invertebrados terrestres



acumulan metales pesados y pesticidas presentes en el suelo, y en zonas muy contaminadas las aves que se alimentan de estos animales están en riesgo (Orłowski *et al.*, 2012). Los desastres ambientales, como anteriormente se ha indicado, son otras de las fuentes de contaminantes metálicos, a las que las aves están expuestas directamente y donde su utilización en la monitorización e investigación sea espacial o temporal, se revela útil y muy interesante (Baos *et al.*, 2012).

3.2. Elementos químicos tóxicos

En este apartado tratamos los elementos químicos de mayor interés por su elevada toxicidad (As, Cd, Hg y Pb) describiendo para cada uno algunas generalidades (fuentes naturales y antropogénicas, forma química más común, usos más frecuentes), su exposición y cinética (absorción, acumulación en los tejidos y excreción), y su toxicidad y efectos tóxicos. Siempre que sea posible la cinética y la toxicidad se refieren a datos en aves, aunque si la información en aves es escasa se incluyen referencias bibliográficas sobre mamíferos (incluyendo humanos).

3.2.1. Arsénico

3.2.1.1. Generalidades

El As es un elemento ubicuo, constituyente natural de más de 245 minerales, que se encuentra principalmente en la forma trivalente y pentavalente (Garland, 2007). Los compuestos inorgánicos trivalentes son el trióxido de arsénico y el arsenito de sodio, mientras que los compuestos inorgánicos pentavalentes más comunes son el arseniato de sodio, el pentóxido de arsénico y el ácido arsénico (Liu *et al.*, 2010). Minerales y volcanes son fuentes naturales de As (Eisler, 2004). Las fuentes no naturales son productos comerciales relacionados con la agricultura (insecticidas, herbicidas), alguicidas, la gasolina con plomo y productos medicinales (ej. para el tratamiento de la tripanosomiasis en humanos, el tratamiento de la dirofilariosis en los perros y la terapéutica de la histomoniasis en pavos y gallinas) (Eisler, 1988; Garland, 2007). Muchos de los primeros pesticidas utilizados eran sales metálicas de As, tales como el arseniato de plomo y en algunas zonas del globo los suelos permanecen aún contaminados por el uso de estos compuestos (Levengood y Beasley, 2007).

3.2.1.2. Exposición y cinética del arsénico

Además de las emisiones atmosféricas (Eisler, 1988), los seres vivos están expuestos al As sobre todo a través del agua y dietas contaminadas. Los arsenicales solubles son fácilmente absorbidos a través de la piel y del tracto intestinal (Ensley, 2004). Una vez absorbido, el As se distribuye a través de la sangre, acumulándose en el hígado y también en el bazo, riñones y pulmón (Garland, 2007). Estudios experimentales en gallinas (*Gallus gallus*) indicaron un metabolismo rápido de los arsenicales después de ingeridos en la dieta, siendo la forma inorgánica pentavalente rápidamente absorbida a nivel intestinal (Eisler, 2004). Las formas pentavalentes son excretadas en las heces y las trivalentes en la bilis (Ensley, 2004). El As es eliminado por la secreción urinaria y



también por descamación de la piel y a través del sudor de algunos animales (Garland, 2007; Sacristán, 2012).

3.2.1.3. Toxicidad del arsénico en aves

La acción tóxica del As se debe en parte a la afinidad que tiene por el azufre (S), uniéndose a los grupos que contienen -SH, desactivando en consecuencia enzimas que contienen estos grupos y requieren ácido lipoico como coenzima (de la Casa-Resino, 2014). En las aves este metaloide puede ser responsable de efectos negativos no específicos como fiebre, anemia, leucopenia, melanosis, alteraciones en la reproducción, debilidad, temblores, incoordinación muscular, y alteraciones en el sistema nervioso central y periférico (Benito *et al.*, 1999; Eisler, 1988a; Sacristán, 2012). Hay evidencias que en las intoxicaciones agudas la presencia de congestión, edema y hemorragia ocurre en la mayoría de los órganos viscerales de los animales (Garland, 2007). En humanos, el As es considerado alérgeno, mutágeno y carcinógeno (está asociado a tumores cutáneos, del pulmón, vejiga, hígado) (Liu *et al.*, 2010). La ausencia de un patrón claro de respuesta genotóxica al As y metales pesados es frecuente en varias especies de aves, pero Baos *et al.* (2006a) encontraron relaciones estadísticamente significativas entre daño del ADN y la presencia de As en la cigüeña blanca. Los compuestos inorgánicos del As son generalmente más tóxicos que los arsenicales orgánicos y las formas trivalentes son más tóxicas que las formas pentavalentes (Ensley, 2004).

3.2.2. Cadmio

3.2.2.1. Generalidades

El Cd es un elemento distribuido en la corteza terrestre, principalmente en la forma de metal bivalente unido al Zn (Furness, 1996). Los incendios forestales y las erupciones volcánicas son sus fuentes naturales de contaminación (Burger, 2008), aunque la mayoría de su acumulación en el ambiente y biota resulta de actividades humanas como la fundición, la quema de carbón y aceites, combustión de plásticos, del uso de algunos fertilizantes, vertidos industriales y municipales (Eisler, 1985a; Furness, 1996). Es un metal de reciente descubrimiento (siglo XIX), no fue muy utilizado en la industria hasta la década de los 90 del siglo XX (Gómez-Ramírez, 2011), momento en que empezó a emplearse en una multitud de aplicaciones (Sacristán, 2012). Es un metal aprovechado por su gran resistencia a la corrosión, empleado como pigmento de pinturas y en electrónica porque es un excelente conductor eléctrico, como en las baterías recargables de Ni-Cd (Levengood y Beasley, 2007). Depósitos de este metal se pueden encontrar en el aire, en el agua y en la tierra. Como es menos volátil que el Hg y el Pb, su concentración en el aire es menos importante en comparación a otros metales (Furness, 1996), sin embargo, puede ser transportado atmosféricamente unido a partículas finas (Burger, 2008). De acuerdo con la Agencia Europea del Ambiente (en inglés *European Environment Agency*, EEA) las emisiones de Cd en 33 países europeos disminuyeron un 64% de media, entre 1990 y 2017 (European Environment Agency, 2019) (**Figura 3**).



3.2.2.2. Exposición y cinética del cadmio

Aunque la absorción gastrointestinal del Cd es más baja que por la vía respiratoria (Wayland y Scheuhammer, 2011), la inhalación asume menor importancia en la exposición a este elemento (Burger, 2008). Por eso, la exposición en aves silvestres es, a similitud de otros metales, principalmente debida a la dieta (Burger, 2008; Hooser, 2007a). Después de absorbido es transportado en el torrente sanguíneo unido a albumina y fracciones proteicas de los glóbulos rojos y linfocitos hasta los órganos diana: hígado y riñón (Coourdassier *et al*, 2012; Hooser, 2007a). En un estudio experimental en patos que fueron alimentados con una dieta con Cd a lo largo de 90 días, sus concentraciones sanguíneas tras 30 días de ser retirado de la dieta bajaron entre un 15 y 70% (Wayland y Scheuhammer, 2011), lo que sugiere que el Cd desaparece de la circulación sanguínea relativamente rápido. En el hígado se une a unas proteínas específicas, las metalotioneínas, y después es redistribuido en forma de complejos hasta el riñón (Burger, 2008; Wayland y Scheuhammer, 2011; Wren *et al.*, 1995). Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular (6500 dalton), cuya síntesis puede ser inducida tras exposición a algunos metales en diversos tejidos, principalmente en el hígado y riñón (Wayland y Scheuhammer, 2011).

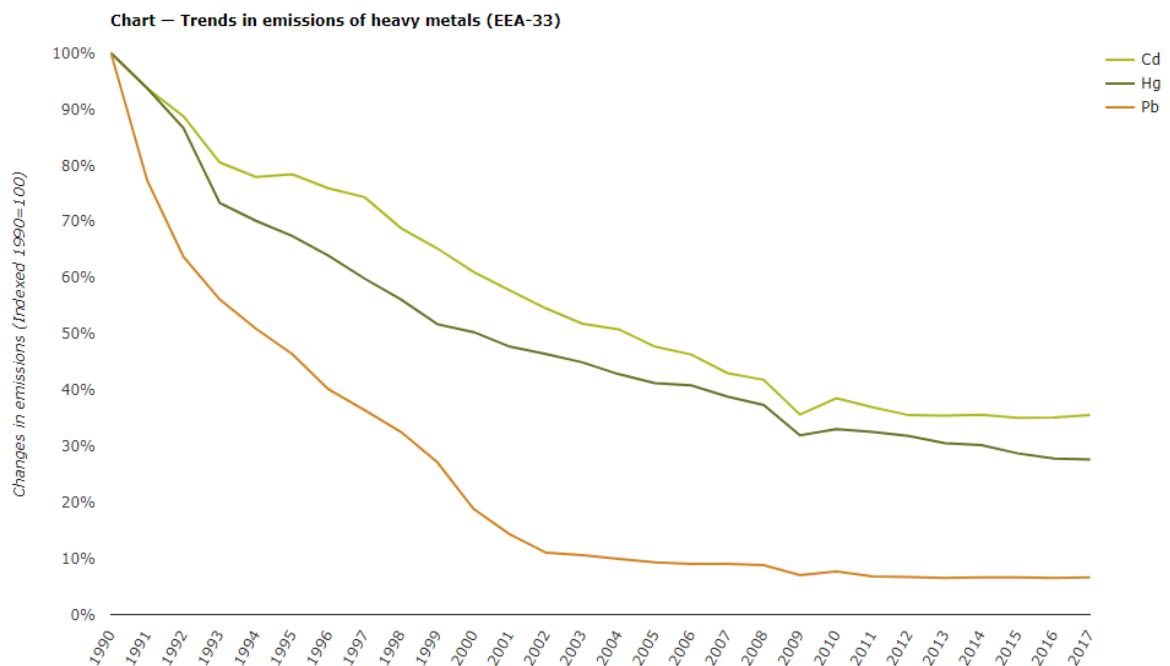


Figura 3.- Emisiones de metales pesados Cd, Hg, Pb entre 1990 y 2017, en países europeos, en índice calculado a partir de las toneladas emitidas durante el año 1990, toneladas en 1990=100. Adaptado de “Heavy metal emissions (APE 033)” (European Environment Agency, 2019).



Además del Cd, también el Hg inorgánico, el Zn y el Cu inducen a la síntesis de estas proteínas (Wayland y Scheuhammer, 2011). Unido a las metalotioneínas el Cd puede acumularse a lo largo de los años (Furness, 1996), más de 20 años en humanos (Scheuhammer, 1987). En el hígado se acumula aproximadamente la mitad de la carga corporal siendo el contenido en este órgano extremadamente estable. Por ello, el tejido hepático es un monitor de la exposición total al Cd. Aunque sus concentraciones en el riñón pueden ser mayores que en el hígado, caen significativamente después de la producción de daño tubular inducida por él mismo (Scheuhammer, 1987). En aves silvestres, su absorción puede estar influenciada por niveles deficientes de Ca, Zn o Fe en la dieta y también por lesiones previas en el epitelio intestinal (Furness, 1996). En humanos y otros mamíferos es eliminado principalmente por vía urinaria, mientras que en aves la excreción en la orina es muy lenta (Sacristán, 2012). Independientemente de los niveles dietéticos consumidos muy poco Cd se transfiere a los huevos del ave (Furness, 1996; Scheuhammer, 1987). Las plumas pueden ser útiles como muestras para determinar sus concentraciones porque durante el crecimiento de la pluma el Cd es eliminado y depositado en ellas (Burger, 1993). En menores cantidades puede existir una contaminación de la superficie de la pluma por el Cd atmosférico (Furness, 1996). El Cd sufre bioacumulación y bioconcentración principalmente en organismos de agua dulce, pero, en estudios en aves, su biomagnificación en la cadena trófica no está comprobada (Burger, 2008).

3.2.2.3. Toxicidad del cadmio en aves

Diferentes efectos tóxicos en las aves le han sido atribuidos tras la exposición accidental o experimental: perturbaciones en el metabolismo del Fe, Zn y Ca, la inducción de metalotioneínas, defectos en el desarrollo de los huesos, efectos reproductivos (como daño testicular), daño e insuficiencia renal, hipertrofia cardíaca y adrenal, anemia, hiperplasia de la médula ósea, disminución y supresión de la producción de huevos, cáscara de huevo adelgazada, alteraciones de comportamiento (Burger, 2008; Furness, 1996; Kamiński *et al.*, 2007; Wayland y Scheuhammer, 2011). Algunos de estos daños pueden ser consecuencia de las alteraciones que el Cd provoca en el metabolismo de otros elementos como el Fe, como es el caso de la anemia inducida por Cd, la hiperplasia de la médula ósea y la hipertrofia cardíaca, efectos similares a los causados por la deficiencia del Fe (Scheuhammer, 1987). El Cd también puede inhibir enzimas con actividad antioxidante (Kurhalyuk *et al.*, 2006b). En la sangre de pollos de cigüeña blanca se comprobó una relación entre la concentración de Cd y los niveles de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que son una medida de la peroxidación lipídica (de la Casa-Resino *et al.*, 2015; Kamiński *et al.*, 2007).

3.2.3. Mercurio

3.2.3.1. Generalidades

El Hg es un metal ubicuo, en el medio ambiente se encuentra naturalmente en forma de vapor como resultado de la actividad volcánica y liberación de sus gases (Goutner *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010; Thompson, 1996). Como otros metales, el Hg es utilizado por el



hombre desde de la Antigüedad. Entre los varios desastres e intoxicaciones reportadas con este elemento, la identificación de la “enfermedad de Minamata” en la década de los 60 en el siglo XX, en la bahía de Minamata (Japón) como resultado de la exposición crónica al metilHg (MeHg), lo trajo definitivamente a la palestra como un peligro ambiental grave para los seres humanos y la vida silvestre (Burger y Gochfeld, 1997). Actualmente, la minería, la fundición, la incineración de residuos sólidos, la utilización en la extracción del oro y pilas son responsables de la mayor parte de las emisiones de este metal pesado en el medio ambiente (Burger y Gochfeld, 1997; Gupta, 2007). Sin embargo, las emisiones de Hg en muchos países europeos disminuyeron acentuadamente entre 1990 y 2017 (European Environment Agency, 2019) debido a restricción de su uso (**Figura 3**). Existe en varias formas químicas y físicas como la forma elemental (Hg metálico), el inorgánico y en la forma de compuestos orgánicos, principalmente MeHg que se encuentra globalmente distribuida (Álvarez *et al.*, 2013; Del Lama *et al.*, 2011; Gupta, 2007). Es un metal muy volátil y puede ser transportado en la atmósfera hasta áreas remotas de su producción (Goutner *et al.*, 2011; Pérez-López *et al.*, 2006), sea por el aire o por la precipitación y depósitos existentes en agua (Goutner *et al.*, 2011). El vapor de Hg emitido por fuentes naturales o antropogénicas para la atmósfera puede ser convertido en una forma soluble hasta después de un año y regresar a tierra a través de la precipitación (Liu *et al.*, 2010). Rápidamente puede ser devuelto a vapor por microorganismos y reemitido a la atmósfera o quedarse adherido a los sedimentos acuáticos donde se somete a la conversión microbiana a MeHg, transfiriéndose al plancton, luego a peces herbívoros, y finalmente ascendiendo a peces carnívoros y mamíferos marinos (Liu *et al.*, 2010). Por lo tanto, el Hg recircula durante largos períodos y su persistencia en el ambiente es bastante importante; la duración media en suelos terrestres puede llegar hasta los 1000 años y en aguas oceánicas hasta los 3200 años (Eisler, 1987).

3.2.3.2. *Exposición y cinética del mercurio*

La absorción del Hg depende de la forma química del metal. La forma metálica es absorbida principalmente en el pulmón y en muy poca cantidad en el tracto gastrointestinal (Gupta, 2007). Una vez en el torrente sanguíneo es rápidamente distribuido principalmente hasta el riñón, donde se acumula (Liu *et al.*, 2010). En esta forma el Hg es muy lipofílico y puede atravesar la barrera hematoencefálica y la barrera fetoplacentaria en mamíferos (Gupta, 2007). La mayor parte del Hg metálico absorbido es excretada en la orina y las heces, en cantidad residual en el aire exhalado y en la leche en los mamíferos (Gupta, 2007).

De manera similar, el Hg inorgánico es absorbido en el tracto gastrointestinal, distribuido por varios órganos y se acumula en el riñón, aunque no atraviesa las barreras hematoencefálica y fetoplacentaria y es excretado en la orina y en las heces (Gupta, 2007).

El MeHg es generado a partir de la transformación del Hg inorgánico por bacterias y hongos (Gilbert, 2012; Gupta, 2007). Su absorción gastrointestinal es casi de 100% (Scheuhammer, 1987). En comparación con otros organomercuriales, el MeHg es metabolizado más lentamente y tiene una tasa de excreción inferior, así su vida media



biológica puede llegar hasta los 2-3 meses en varias especies de aves (Scheuhammer, 1987). Es especialmente importante por su capacidad de acumulación y biomagnificación en la cadena alimentaria (Álvarez *et al.*, 2013; Gupta, 2007), principalmente a nivel acuático, ya que es rápidamente absorbido por los organismos acuáticos. En el ambiente terrestre la bioacumulación es menor porque en el suelo el Hg es fijado, transferido a las plantas y se concentra en las raíces (Wren *et al.*, 1995).

En aves el Hg se deposita en las plumas principalmente durante su formación. Como tiene afinidad por los grupos tiol (-SH) de algunos aminoácidos que son abundantes en la queratina forma con ellos uniones disulfuro estables (Burger y Gochfeld, 1997) por lo que una vez unido a la matriz de la pluma queda “atrapado” en ella (Scheuhammer, 1987). Por ello, las plumas son una buena matriz para determinar la exposición al Hg porque se relacionan con sus concentraciones sanguíneas en las primeras semanas de vida cuando la pluma está en formación y está bastante bien irrigada (Burger y Gochfeld, 1997; Goutner *et al.*, 2011). Las aves reproductoras lo excretan por los huevos y por eso la concentración del metal puede ser menor en hembras reproductoras que en los machos con una exposición similar (Scheuhammer, 1987).

3.2.3.3. Toxicidad del mercurio en aves

Según algunos investigadores el mecanismo de toxicidad del Hg se relaciona con la inhibición de enzimas dependientes del Se, que son importantes en la prevención y reversión de los daños oxidativos en los seres vivos (Álvarez *et al.*, 2013). Todos los compuestos de Hg interfieren con el metabolismo del grupo -SH lo que puede provocar una inactivación de varias enzimas, proteínas estructurales y de transporte (Eisler, 1987; Gupta, 2007). Están descritas diferencias en la susceptibilidad al MeHg entre distintas especies de aves (Scheuhammer, 1987). La exposición al Hg puede afectar la reproducción, el cerebro, el corazón, los riñones, los pulmones, el sistema inmunitario, conducir a crecimiento y desarrollo reducidos, disminución del tamaño de la puesta, comportamiento anormal y a la muerte (Álvarez *et al.*, 2013; Burger y Gochfeld, 1997; Scheuhammer, 1987), siendo el sistema nervioso especialmente sensible (Gupta, 2007).

3.2.4. Plomo

3.2.4.1. Generalidades

El Pb es un elemento altamente tóxico (Pattee y Pain, 2003; Thompson, 2007a) y el metal pesado más ampliamente distribuido en nuestro planeta debido a la actividad humana (Gwaltney-Brant, 2004). Forma parte de más de 200 minerales, pero es relativamente raro en la constitución de la corteza terrestre (Pattee y Pain, 2003). Por procesos naturales solo pequeñas cantidades son liberadas en el ambiente. Las fuentes antropogénicas en el medio ambiente son incontables, se relacionan principalmente con actividades como la minería, la producción de algunos vidrios/cristales plomados, baterías, pigmentos y productos químicos, recubrimiento de cables, las emisiones de vehiculares que usan combustible plomado, vertederos, e incluso los perdigones utilizados en actividades deportivas como la caza y la pesca (plomadas) (Fisher *et al.*, 2006; Franson y Pain, 2011; Gilbert, 2012;



Gwaltney-Brant, 2004; Richardson, 2006; Thompson, 2007a). El hombre utiliza el Pb desde hace miles de años, pero la demanda aumentó enormemente durante la revolución industrial (siglos XVIII y XIX) y de nuevo tras la aprobación de los compuestos orgánicos de Pb como agentes antidetonantes en la gasolina, en el siglo pasado (Pattee y Pain, 2003). Los grandes centros urbanos han sido responsables de gran parte de la emisión atmosférica de Pb, ya que la fuente más importante fue atribuida a las emisiones de vehículos.

En la actualidad, en los países más industrializados hay muchas restricciones al uso de Pb, y se ha prohibido su uso en algunas actividades y procesos, como ejemplos, la prohibición del tetraetilo de plomo como catalizador de la combustión de la gasolina, o la del uso de perdigones de Pb en la caza, limitando el riesgo de ingestión por parte de aves acuáticas o rapaces, al ser sustituidos por perdigones de acero (Fisher *et al.*, 2006). De acuerdo con la European Environment Agency (2019) las emisiones de plomo en 33 países europeos disminuyeron en general un 93% entre 1990 y 2017, aunque desde 2004 pocos progresos fueron hechos para limitar emisiones en el futuro. Esa disminución fue del 98% en el caso del sector transporte tras la prohibición de la gasolina plomada, aunque este sector sigue siendo una fuente importante, ya que contribuye con alrededor del 19,6% de la emisión total de Pb en la región EEA-33.

Las partículas atmosféricas de Pb más pequeñas pueden ser transportadas a nivel mundial por los vientos alisios (Patee y Pain, 2003) hasta lejos del local de emisión y depositarse, por ejemplo, en ambientes rurales. El Pb puede acumularse en el suelo, en las plantas, principalmente retenido en las raíces, o depositado en las hojas.

3.2.4.2. Exposición y cinética del plomo

Este metal puede entrar en el organismo por ingestión, con los alimentos o agua contaminada o inhalación de polvo contaminado. El envenenamiento causado por la ingestión de perdigones de Pb no es solo una preocupación importante en aves acuáticas, sino también en las aves terrestres siendo muchas veces la causa más probable del descenso en algunas poblaciones de aves a nivel mundial (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011). El Pb ingerido por las aves puede tener también su origen en fuentes ambientales como vertederos y plantas industriales (Fisher *et al.*, 2006). Su absorción por la vía digestiva depende de su forma química, del tamaño de la partícula (Buekers *et al.*, 2009) y del estado fisiológico del ave, ya que por ejemplo animales con deficiencias en calcio (Ca), Fe, Zn y vitamina D, tienen una absorción incrementada (Thompson, 2007a). El Pb ingerido por el ave es disuelto por los ácidos existentes en el estómago y las sales resultantes son absorbidas y distribuidas por el torrente sanguíneo (Pattee y Pain, 2003). Se transporta asociado a la membrana de los eritrocitos (más de 90%), principalmente unido a la hemoglobina y el restante unido a albumina o compuestos tiol (Franson, 1996; Gwaltney-Brant, 2004; Thompson, 2007a) y es distribuido al hígado, riñón y otros tejidos blandos, plumas en crecimiento y tejido óseo (Franson y Pain, 2011; Ramírez, 2011). Al atravesar la barrera hematoencefálica llega hasta el cerebro (Thompson, 2007). Se acumula en la matriz ósea, sirviendo de depósito a largo plazo absorbido (García-Fernández *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2003; Thompson, 2007a). En los tejidos blandos se



une a diversas proteínas, así como a las metalotioneínas. Su cinética en aves es semejante a lo que sucede en mamíferos y se clasifica como tricompartmental, donde se consideran tres compartimentos cinéticos en un equilibrio constante (sangre, hígado, hueso) (Liu *et al.*, 2010). En exposiciones crónicas el plomo acumulado en el hueso puede ser liberado o movilizado como consecuencia de procesos de regeneración ósea (Liu *et al.*, 2010). En el hígado sufre biotransformación y es incorporado lentamente en la bilis y consecuentemente excretado en las heces (Thompson, 2007a; Gwaltney-Brant, 2004); en cantidades muy pequeñas es excretado en la orina (Thompson, 2007a). Las hembras acumulan Pb a un ritmo mayor que los machos, además las hembras en puesta pueden acumular hasta 4 o 5 veces más cantidad que las hembras que están en otra situación reproductiva (Scheuhammer, 1987b). La mayor absorción en las hembras de aves puede relacionarse con la renovación del Ca del esqueleto, que es necesario para la formación de la cáscara de los huevos. Pero la transferencia de Pb a los huevos es considerada residual (Tsuji y Karagatzides, 2001). Tanto el Pb circulante como el hepático pueden ser transferidos y depositados en las plumas en formación (Honda *et al.*, 1986). Debido a la cinética descrita, la sangre, el hígado y el riñón son los tejidos generalmente elegidos para evaluar la exposición reciente (Franson y Pain, 2011; Tsipoura *et al.*, 2008) y el hueso es un indicador de exposición crónica (Franson, 1996; Mateo *et al.*, 2003).

3.2.4.3. Toxicidad del plomo en aves

Todos los efectos conocidos del Pb sobre los sistemas biológicos son deletéreos, algunos de los más estudiados incluyen alteraciones en el sistema nervioso, aprendizaje, comportamiento y reproducción (Fisher *et al.*, 2006; Thompson, 2007a; Tsuji y Karagatzides, 2001). Los efectos nocivos para la salud y el envenenamiento agudo han sido ampliamente investigados y descritos, principalmente en aves acuáticas, asociado a la contaminación del medio acuático debida a los perdigones de este metal. Una de las principales preocupaciones es la exposición crónica porque incluso una absorción a muy bajas concentraciones puede llevar a una amplia gama de efectos subletales y traducirse en efectos fisiológicos mensurables (Franson and Pain, 2011). Los niveles y efectos nefastos en varias especies de aves están ampliamente descritos incluyendo: disminución en la concentración media de hemoglobina y hematocrito; alteraciones en el sistema reproductivo (Fisher *et al.*, 2006); daños en el sistema inmunitario y neurológico; problemas en el sistema digestivo; alteraciones en el tejido óseo, hígado y riñón; efectos carcinógenos (Buekers *et al.*, 2009; Burger, 1995; Franson y Pain, 2011). También altera la hemoglobina (Gwaltney-Brant, 2004) ya que a partir de determinadas concentraciones sanguíneas es responsable de la inhibición de las enzimas implicadas en la síntesis del grupo hemo, como es el caso de la Δ -ALAD, la hemo-sintetasa y la ferroquelatasa (Fisher *et al.*, 2006). La inhibición de la actividad Δ -ALAD como efecto directo de la exposición al plomo fue demostrada en muchos estudios en humanos, mamíferos, aves silvestres y peces (Espín *et al.*, 2015; Franson y Pain, 2011; Melancon, 2003; Peixoto *et al.*, 2003). En el citosol, la Δ -ALAD convierte dos moléculas de ácido aminolevulínico (ALA) en porfobilinógeno (PBG) (Espín *et al.*, 2015; Kaneko *et al.*, 2008). El plomo inhibe la actividad de esta enzima al unirse a los grupos sulfhidrilos (SH) y desplazando al Zn metal esencial para esta actividad enzimática (Alaya-Ltifi *et al.*, 2015; Martínez-López *et al.*,



2004). Se produce una acumulación de ALA, que puede ser oxidado y llevar a la formación de ROS (Martínez-Haro *et al.*, 2011). La inhibición de la Δ -ALAD ocurre en las horas siguientes a la exposición al Pb y, dependiendo de la duración y nivel de exposición, se puede mantener hasta semanas o meses (Pain, 1989). Sin embargo, presenta en los animales notables diferencias interespecíficas por lo que es necesario profundizar en su conocimiento, tanto respecto a sus valores basales como a sus correlaciones con la carga corporal de plomo siendo sus efectos en aves, según algunos autores, más importantes que en mamíferos (Dieter *et al.*, 1977; Gómez-Ramírez *et al.*, 2011; Martínez-López *et al.*, 2004)

3.3. Elementos esenciales

3.3.1. Cobalto

3.3.1.1. Generalidades

El Co se usa en pigmentos, en imanes permanentes y como aleación para endurecer otros metales. Es un cofactor esencial para la formación de la vitamina B₁₂, que es indispensable para los animales y muchas bacterias, interviene en la eritropoyesis, granulocitopoyesis y homeostasis de la glucosa (Rucker *et al.*, 2008). Su absorción de la dieta está disminuida cuando hay grandes cantidades de Fe (Rucker *et al.*, 2008). Las señales y alteraciones bioquímicas de su deficiencia se relacionan directamente con la deficiencia en vitamina B₁₂, así como la anemia.

3.3.1.2. Toxicidad de cobalto en aves

Como otros elementos esenciales el Co puede ser tóxico a determinadas concentraciones (Benito *et al.*, 1999), aunque faltan referencias de valores tóxicos en aves. Sus concentraciones en la mayoría de los tejidos son bajas (del orden de picomoles) y no es almacenado en grado apreciable en la edad adulta (Rucker *et al.*, 2008). No está descrita toxicidad de Co en condiciones naturales, y los casos de toxicidad podrían resultar de la inhalación de fuentes directas del mismo o de una complementación accidental y excesiva en la dieta de las aves (Rucker *et al.*, 2008).

3.3.2. Cobre

3.3.2.1. Generalidades

El Cu es un metal común en la naturaleza y esencial para el metabolismo de todos los seres vivos (Eisler, 1998a; Thompson, 2007b). Fue probablemente uno de los primeros metales trabajado por los seres humanos (Eisler, 1998a). Algunas de las emisiones de Cu son de origen natural, consecuencia de erupciones volcánicas, pero la mayoría son debidas a la minería, metalurgias, refinerías, eliminación de residuos domésticos, utilización de fungicidas y molusquicidas (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011). A nivel doméstico el Cu está presente en tuberías, material eléctrico y aire acondicionado, es utilizado en la forma de sulfato como insecticida (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011). En áreas



de agricultura y, principalmente, de ganadería intensiva los excrementos de los animales pueden contener niveles significativos del mismo (debido a suplementos en la dieta) que pueden contaminar los suelos (Orłowski *et al.*, 2012).

Es un elemento esencial para la síntesis de la hemoglobina, que forma parte de las enzimas citocromo oxidasa, monoaminoxidasa plasmática, la tirosinasa (producción de melanina), y superóxido dismutasa, estando involucrado en las reacciones redox (detoxificación de los radicales libres) (Eisler, 1998a; Thompson, 2007b).

3.3.2.2. Exposición y cinética del cobre

Este metal además de la absorción en la dieta puede ser absorbido por vía cutánea e inhalatoria (Rucker *et al.*, 2008; Davidson *et al.*, 2015). Normalmente está presente en mayor concentración en el hígado, cerebro, corazón y cabello en humanos (Rucker *et al.*, 2008). En exceso se une a las metalotioneínas y es almacenado principalmente en el hígado (Wayland y Scheuhammer, 2011).

3.3.2.3. Toxicidad del cobre en aves

En aves el Cu en exceso puede conducir a atrofia testicular, dermatitis gangrenosa y dilatación del proventrículo (Osofsky *et al.*, 2001).

3.3.3. Cromo

3.3.3.1. Generalidades

Los niveles de Cr son elevados en el suelo, aire, agua y próximo de industrias de metalurgia (Eisler, 1985b). Se utiliza este metal para aportar resistencia a la corrosión, como por ejemplo en las pinturas cromadas como tratamiento antioxidante.

El Cr puede existir en varias formas químicas, la hexavalente Cr^{6+} producida en procesos industriales es la forma biológicamente más activa y la que puede ser más tóxica (ATSDR, 2019), siendo la sensibilidad entre especies muy variable (Eisler, 1986). A altas concentraciones, en condiciones de laboratorio, es mutagénico, teratogénico y carcinogénico (Eisler, 1986), habiéndose documentado efectos teratogénicos en gallinas, principalmente de Cr^{6+} , y en humanos, la inhalación de este a altas concentraciones provoca daños en el sistema respiratorio y cáncer (ATSDR, 2019).

3.3.4. Hierro

3.3.4.1. Generalidades

El Fe es un elemento esencial abundante, es componente de la hemoglobina y necesario a muchas enzimas (Osofsky *et al.*, 2001). En la hemoglobina y en la mioglobina transporta el oxígeno y está implicado en reacciones de oxidación-reducción. También está presente en el citocromo P450 y por eso es fundamental en el metabolismo de muchas sustancias principalmente en el hígado, pero también en otros órganos (Hooser, 2007b). El Fe metálico contenido en aleaciones con otros metales y el óxido de hierro no son fácilmente ionizados por lo que no suelen estar asociados a toxicidad (Osweiler *et al.*, 2011).



A través de la dieta, solo 5 a 15% del Fe contenido en los alimentos sufre absorción a nivel gastrointestinal (Hooser, 2007b), y lo hace en la forma ferrosa (Fe^{2+}), siendo en el suero, en la forma férrica (Fe^{3+}), dónde se une a la transferrina y en menor porcentaje a la ferritina (Hooser, 2007b). La mayor parte de los organismos tiene dificultad en excretar el Fe en exceso (Osweiler *et al.*, 2011). Gran parte del Fe en el organismo está unido a hemoglobina (75%), mioglobina (10%) y el restante a la ferritina y hemosiderina, que están en mayor concentración en el hígado, bazo y médula ósea (Hooser, 2007b). Cuando hay una sobredosis de Fe la transferrina puede saturarse llevando a un aumento del Fe^{2+} libre en la circulación (Osweiler *et al.*, 2011), el cual es muy reactivo y puede llevar a la formación de ROS (Hooser, 2007b).

3.3.4.2. Toxicidad del hierro en aves

Tanto el exceso como su deficiencia pueden ser lesivos y comprometer el funcionamiento celular (Davidson *et al.*, 2015). Su deficiencia resulta en anemia, y su exceso tiene como consecuencia su acumulación, principalmente en el hígado, lo que puede llevar a daño hepático. La acumulación del Fe debida a un desorden genético, designada de hemocromatosis, ha sido identificada en varias especies de aves (Osofsky *et al.*, 2001) y da lugar a disnea, insuficiencia hepática y muerte súbita (Hooser, 2007b). Además, el Fe^{2+} del grupo hemo en la hemoglobina puede ser oxidado a Fe^{3+} resultando en la transformación de la hemoglobina en metahemoglobina e incapacitando los glóbulos rojos para el transporte del oxígeno (Hooser, 2007b).

3.3.5. Níquel

3.3.5.1. Generalidades

El Ni es un metal ubicuo, persistente y bioacumulable (Eisler, 1998b). Su clasificación como elemento nutricional esencial es controvertida, y raramente son referidas deficiencias en Ni (Rucker *et al.*, 2008). Las actividades de minería, la combustión de residuos fósiles y la quema de residuos urbanos son algunas de las actividades humanas que contribuyen a la liberación de este al medio ambiente (Eisler, 1988b). Se utiliza en aleaciones, especialmente para el endurecimiento del acero, en galvanoplastia y como catalizador en la síntesis orgánica (Eisler, 1988b).

3.3.5.2. Toxicidad del níquel en aves

Su estado físico y la forma química afecta a la toxicidad y la biodisponibilidad del metal (Eisler, 1988b). Los compuestos de Ni inducen estrés oxidativo, inestabilidad genómica, daños en los cromosomas, son mutagénicos y genotóxicos (Davidson *et al.*, 2015). En estudios experimentales con aves alimentadas con diferentes concentraciones, los principales efectos adversos fueron disminución del desarrollo y crecimiento y tasa de supervivencia reducida (Eisler, 1988b).



3.3.6. Selenio

3.3.6.1. Generalidades

El Se es un no metal, elemento esencial para las aves y otros animales. Es imprescindible para el funcionamiento de varias enzimas, como la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (Marriott *et al.*, 2007). También es importante para el correcto funcionamiento del músculo, sea cardíaco o esquelético (Kerr, 2002; Ramírez, 2011). Puede ser liberado en el ambiente por actividades antropogénicas relacionadas con la quema de residuos fósiles y basura, aunque la erosión natural de las rocas es también una de sus fuentes más importantes (Eisler, 1985b), además de que algunos suelos son ricos en Se (suelos seleníferos). La intoxicación por Se es bien conocida desde antiguo, y ya Marco Polo, en 1295, describió síntomas en animales domésticos en la China occidental que se pueden asociar a esta intoxicación. Una de las primeras intoxicaciones documentada en aves ocurrió en 1930, cuando fue identificado como la causa de anomalías en el desarrollo y la muerte de embriones de gallinas, que habían sido alimentadas con granos procedentes de suelos con alto contenido de este elemento, en Dakota del Sur, Estados Unidos (Ohlendorf y Heinz, 2011). Es bioacumulado en la cadena trófica terrestre y principalmente en la acuática, pero no sufre biomagnificación.

3.3.6.2. Exposición y cinética del selenio

La mayor fuente para los animales es la alimentación, existiendo un intervalo estrecho entre valores necesarios a la vida y los valores tóxicos (Ohlendorf, 2003).

En aves es absorbido vía digestiva, pasa al torrente sanguíneo, y en hembras reproductoras pasa hacia los huevos (Evers *et al.*, 2003). El Se contribuye al proceso de desintoxicación del Hg, como ya se describió.

3.3.6.3. Toxicidad del selenio en aves

El Se tiene una estructura química compleja y en el ambiente aparece con distintas formas químicas que presentan diferentes niveles de toxicidad para las aves (Ohlendorf y Heinz, 2011). Los selenatos y selenitos son las formas químicas más comunes. La exposición a niveles tóxicos ha sido asociada con problemas a nivel reproductivo, como disminución de la fertilidad, deformaciones en los embriones, atrasos en el crecimiento de pollos de pato, bajas tasas de supervivencia en juveniles y aves adultas (Álvarez *et al.*, 2013), defectos en los ojos (microftalmia y anoftalmia); anomalías en el pico (disminución de la anchura y desarrollo incompleto); y alteraciones en el cerebro (hidrocefalia) (Ohlendorf, 2003).

3.3.7. Zinc

3.3.7.1. Generalidades

El Zn es un elemento residual esencial, poco abundante en la corteza terrestre y cuya concentración en la biosfera se debe principalmente a la actividad minera. Es empleado en aleaciones con otros metales, como el Ni, aluminio (Al), bronce y también en el galvanizado del Fe (Gómez-Ramírez, 2011). Forma parte de varias metaloenzimas, siendo fundamental en las que regulan el ARN y ADN (Eisler, 1993) y en procesos implicados en la inmunidad. En humanos están descritas diversas proteínas responsables



de su transporte a través de las membranas celulares (Davidson *et al.*, 2015). Un exceso de Zn puede ser una fuente de estrés para las aves, aunque esto no siempre acontece, pues la concentración de este metal en el organismo puede no estar relacionada directamente con la exposición al mismo, ya que se regula metabólicamente (Pérez-López *et al.*, 2008). En mamíferos, su excreción es realizada principalmente a través de las heces, siendo la eliminación renal mínima (Peixoto *et al.*, 2003).

3.3.7.2. Toxicidad del zinc en aves

La toxicosis provocada por Zn en aves produce síntomas tales como poliuria, polidipsia, diarrea, pérdida de peso, debilidad, anemia, cianosis, convulsiones y muerte (Richardson, 2006).

3.3.8. Manganeso

3.3.8.1 -Generalidades

El Mn es un elemento ubicuo que se encuentra en diversos minerales, y es esencial para el normal funcionamiento de todas las especies animales (USEPA, 2014). Es fundamental como cofactor para la actividad de metaloenzimas, como la superóxido dismutasa, la piruvato dismutasa o carboxilasa y la arginasa (Marriott *et al.*, 2007) que son esenciales en la “desintoxicación” de los radicales libres de superóxido.

3.3.8.2 -Vías de exposición

Las vías de exposición más comunes son la digestiva (por la dieta y agua contaminada) y la inhalación, asumiendo esta última de gran importancia en humanos según estudios de toxicología ocupacional (Marriott *et al.*, 2007). En garzas y aves rapaces (aves carnívoras) sus concentraciones fueron superiores a las de las especies omnívoras, que presentaron concentraciones más altas en riñón (Horai *et al.*, 2007).

3.3.8.3 -Toxicidad del manganeso en aves

Normalmente los niveles de Mn en los tejidos son estables, y aunque están descritos algunos efectos de la deficiencia, existe más información en la literatura sobre su toxicidad en humanos, en los que se relaciona con la inhalación de polvo y está descrito que es neurotóxico, como el Hg o el Pb (Bernard, 2008). Algunos estudios relacionaron deficiencias de Mn en la dieta con la disminución en el crecimiento, anomalías esqueléticas en recién nacidos, ataxia y alteraciones en el metabolismo de los lípidos (USEPA, 2014). El cerebro es particularmente susceptible a la exposición a este metal, y en los humanos afectados por la acumulación del mismo están descritas alteraciones neurodegenerativas (Dobson *et al.*, 2004). Horai *et al.* (2007) refieren en aves alteraciones inflamatorias como la neumonía y neumoconiosis inducidas por la adsorción de partículas de Mn.



3.4. Elementos estudiados y concentraciones en sangre de cigüeña blanca

El estudio del impacto de los metales y otros químicos, que se encuentran normalmente en la sangre de los animales en concentraciones muy bajas (ej. Cd), es posible porque la tecnología se desarrolló para medirlos con técnicas cada vez más precisas, como la espectrometría de masas (ICP-MS). Para algunos de los doce elementos descritos hay estudios experimentales que relacionan la ingestión de dieta contaminada, concentración de los metales y otros elementos en distintos tejidos y sangre con la aparición de efectos a nivel bioquímico o fisiológico. Conocer la cinética de los elementos químicos, las concentraciones sanguíneas en cada especie de ave, es fundamental para evaluar y entender los niveles de contaminantes, particularmente en programas de monitorización ambiental ya que uno de los factores que más afecta las concentraciones de contaminantes en sangre y otros tejidos es la especie del ave (Gómez *et al.*, 2004; Wayland *et al.*, 2007). En las **Tablas 2 a 11** se recogen los estudios de metales en sangre de la especie en estudio en la presente investigación, *Ciconia ciconia*. En el caso del Ni no hemos encontrados valores en *Ciconia ciconia*, solo una referencia en coágulos sanguíneos en una especie similar, el ibis africano, *Threskiornis aethiopicus*, con un rango de valores en un humedal contaminado de Sudáfrica entre 6,6 y 62,7 µg/g peso seco (Van Eeden y Schoonbee, 1996). Para el Cr no encontramos datos publicados en Ciconiiformes.

**Tabla 2.** Referencias bibliográficas de **arsénico** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (µg/L)	Autores
pollos	1998 (n=30)	Aznalcóllar, Sevilla, España	19,0 (6-121)	Benito <i>et al.</i> , 1999
24-59 días	2000 (n=20)	Cáceres, España	48,6 ± 46,8 (ND*-205)	Baos <i>et al.</i> , 2006a
	2000 (n=32)	Sevilla, España	34,5 ± 51,4 (ND*-248)	
media de edad: 52 días	1999 (n=64)	P.N. Doñana, Sevilla, España	29,14 ± 22,88 (ND*-104)	Baos <i>et al.</i> , 2006b
	2000 (n=39)		31,68 ± 48,72 (ND*-248)	
	2001 (n=64)		20,78 ± 18,17 (ND*-77)	
	2002 (n=91)		21,06 ± 12,82 (ND*-80,39)	
3 semanas	2005 (n=30)	Varias colonias en Huesca y Zaragoza, España	25,34 (4,83-86,05)	Jiménez y Blázquez, 2008
	2006 (n=20)		41,70 (1,33-187,53)	
3-6 semanas	2011 (n=27)	Los Llanos de Cáceres y Sierra de Fuentes, Cáceres, España (ZEPA)	2,35 ± 1,93 (0,91-10,6)	de la Casa-Resino <i>et al.</i> , 2014a
	2011 (n=22)	Cáceres España (cerca de vertedero)	22,48 ± 31,82 (2,91-108,1)	
	2011 (n=10)	Navalmoral de la Mata, Cáceres, España (zona agrícola y vertedero)	23,04 ± 6,32 (10,80- 31,90)	
pollos	2013 (n=44)	Región Terra Chá, Galicia, España	9,81 (2,87- 94,50)	Pérez-López <i>et al.</i> , 2016
alrededor de 3 semanas	2005 (n=30)	Varias colonias en Huesca y Zaragoza, España	25,34 (4,83-86,05)	Jiménez y Blázquez, 2008
	2006 (n=20)		41,57 (1,33-187,63)	

**Tabla 3.** Referencias bibliográficas de **cadmio** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año. (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (µg/L)	Autores	
pollos	1998 (n=30)	Aznalcóllar, Sevilla, España	1,5 (0,1-9)	Benito <i>et al.</i> , 1999	
media de edad: 52 días	1999 (n=64)		0,31 ± 0,71 (ND*-5,1)		
	2000 (n=39)		No detectable (ND)	Baos <i>et al.</i> , 2006b	
	2001 (n=64)	P.N. Doñana, Sevilla, España	ND		
	2002 (n=91)		0,76 ± 1,09 (ND*-9,85)		
	2005 (n=30)	Varias colonias en Huesca y Zaragoza, España	1,70 (0,20-3,45)	Jiménez y Blázquez, 2008	
3 semanas (aprox.)	2006 (n=20)		2,04 (0,84-4,29)		
	2011 (n=27)	Los Llanos de Cáceres y Sierra de Fuentes, Cáceres, España (ZEPA)	<0,25	de la Casa-Resino <i>et al.</i> , 2014	
	2011 (n=22)	Cáceres España (cerca de vertedero)	<0,25		
3-6 semanas	2011 (n=10)	Navalmoral de la Mata, Cáceres, España (zona agrícola y vertedero)	0,49 ± 0,06 (0,40 – 0,58)		
	14-59 días	2005, 2006 y 2007 (n=48)	Prados de Odra, Kłopot, SO Polonia	2350 ± 1056	
		20-50 días	(n=45)	Cecenowo, Pomerania, N Polonia	2364 ± 1086
17-59 días	(n=56)	Zielona Góra, SO Polonia	2861 ± 1384		
18-62 días	(n=37)	Glogów, (próximo a fundición de cobre), Polonia	2977 ± 1466		
32 días (media)	2005, 2006 (n=14)	Colonia próxima a fundición de cobre, Polonia	5060 ± 30	Kulczykowska <i>et al.</i> , 2007	
	(n=14)	Kłopot, Polonia	2570 ± 16		

**Tabla 4.** Referencias bibliográficas de **plomo** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (µg/L)	Autores
pollos	199 (n=30)	Aznalcóllar, Sevilla, España	70 (2-320)	Benito <i>et al.</i> , 1999
pollos	1999 (n=10)	Doñana, provincia de Sevilla, España	168	Meharg <i>et al.</i> , 2002
24-59 días	2000 (n=20)	Cáceres, España	90,7 ± 51,0 (6-214)	Baos <i>et al.</i> , 2006a
	2000 (n=32)	Sevilla, España	44,4 ± 33,6 (ND-126)	
media de edad: 52 días	1999 (n=64)	P.N. Doñana, Sevilla, España	80,45 ± 37,8 (24-157,54)	Baos <i>et al.</i> , 2006b
	2000 (n=39)		48,84 ± 23,02 (ND-97,76)	
	2001 (n=64)		70,52 ± 39,72 (ND-195,58)	
	2002 (n=91)		73,23 ± 44,40 (18,56-220,5)	
	2011 (n=27)		Los Llanos de Cáceres y Sierra de Fuentes, Cáceres, España (ZEPA)	
3-6 semanas	2011 (n=22)	Cáceres, España (cerca de vertedero)	107,1 ± 170,9 (27,80-780,5)	de la Casa- Resino <i>et al.</i> , 2014a
	2011 (n=10)	Navalmoral de la Mata, Cáceres, España (zona agrícola y vertedero)	146,4 ± 140,2 (53,7-502,7)	
pollos	2013 (n=44)	Región Terra Chá, Galicia, España	36,92 (8,35-186,4)	Pérez- López <i>et al.</i> , 2016
19-56 días	2006	Klopot, SO Polonia	844 ± 655	Kamiński <i>et al.</i> , 2008
		Cecenowo, N Polonia	1147 ± 827	
		Czarnowo, SO Polonia	1731 ± 1075	
		Glogów, SO Polonia	7167 ± 2489	

**Tabla 5.** Referencias bibliográficas de **mercurio** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (µg/L)	Autores
3 semanas (aprox.)	2005 (n=30)	Varias colonias en Huesca y Zaragoza, España	96,53 (15,63-402,37)	Jiménez y Blázquez, 2008
	2006 (n=20)		210,4 (36,38-820,86)	
Pollos	1999 y 2000 (n=7)	Aznalcóllar, Sevilla, España	121 (99,9-146)	Álvarez <i>et al.</i> , 2013
	2011 (n=27)	Los Llanos de Cáceres y Sierra de Fuentes, Cáceres, España (ZEPA)	8,89 ± 5,70 (3,47-31,20)	de la Casa- Resino <i>et al.</i> , 2014
3-6 semanas	2011 (n=22)	Cáceres, España (cerca de vertedero)	24,36 ± 19,46 (6,24-62,10)	
	2011 (n=10)	Navalmoral de la Mata, Cáceres, España (zona agrícola y vertedero)	53,03 ± 35,26 (16,00-118,3)	
Pollos	2013 (n=44)	Región Terra Chá, Galicia, España	16,48 (2,65-63,25)	Pérez-López <i>et al.</i> , 2016

Tabla 6. Referencias bibliográficas de **selenio** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (µg/L)	Autores
Pollos	1999 y 2000 (n=7)	Aznalcóllar, Sevilla, España	382 (328- 445)	Álvarez <i>et al.</i> , 2013
	2011 (n=27)	Los Llanos de Cáceres y Sierra de Fuentes, España (ZEPA)	82,67 ± 29,6 (43,26-18,18)	de la Casa- Resino <i>et al.</i> , 2014
3-6 semanas	2011 (n=22)	Cáceres, España (cerca de vertedero)	142,6 ± 34,32 (92,8-213,9)	
	2011 (n=10)	Navalmoral de la Mata, Cáceres, España (zona agrícola y vertedero)	199,5 ± 49,87 (135,2-278)	

**Tabla 7.** Referencias bibliográficas de **cobalto** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (µg/L)	Autores
Pollos	1998 (n=30)	Aznalcóllar, Sevilla, España	7 (1-16)	Benito <i>et al.</i> , 1999
19-56 días	2006	Kłopot, SO Polonia	2413 ± 1700	Kamiński <i>et al.</i> , 2008
		Cecenowo, N Polonia	1750 ± 900	
		Czarnowo, SO Polonia	2710 ± 1500	
		Glogów, SO Polonia	5580 ± 1850	
14-59 días	2005, 2006 y 2007 (n=48)	Prados de Odra, Kłopot, SO Polonia	2260 ± 1060	
20-50 días	2005, 2006 y 2007 (n=45)	Cecenowo, Pomerania, N Polonia	2250 ± 710	Kamiński <i>et al.</i> , 2009
17-59 días	2005, 2006 y 2007 (n=56)	Zielona Góra, SO Polonia	2750 ± 727	
18-62 días	2005, 2006 y 2007 (n=37)	Glogów, (próximo a fundición de cobre), Polonia	4040 ± 199	

**Tabla 8.** Referencias bibliográficas de **cobre** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (µg/L)	Autores
Pollos	1998 (n=30)	Aznalcóllar, Sevilla, España	586 (180-1530)	Benito <i>et al.</i> , 1999
24-59 días	2000 (n=20)	Cáceres, España	359,5 ± 55,5 (233-451)	Baos <i>et al.</i> , 2006a
	2000 (n=32)	Sevilla, España	357,2 ± 41,1 (247-426)	
media de edad: 52 días	1999 (n=64)		424,34 ± 84,3 (279-776)	Baos <i>et al.</i> , 2006b
	2000 (n=39)	P.N. Doñana, Sevilla, España	351,69 ± 52,6 (236-503)	
	2001 (n=64)		358,86 ± 74,01 (224-622)	
	2002 (n=91)		373,27 ± 81,2 (253-682)	
	2005 (n=30)	Varias colonias en Huesca y Zaragoza, España	300 (150-590)	
3 semanas (aprox.)	2006 (n=20)		333 (240-430)	Jiménez y Blázquez, 2008
19-56 días	2006	Klopot, SO Polonia	7609 ± 3445	Kamiński <i>et al.</i> , 2008
		Cecenowo, N Polonia	11044 ± 1489	
		Czarnowo, SOPolonia	4037 ± 1177	
		Glogów, SO Polonia	10879 ± 4669	

**Tabla 9.** Referencias bibliográficas de **hierro** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (mg/L)	Autores
3-6 semanas	2011 (n=27)	Los Llanos de Cáceres y Cáceres, España (ZEPA)	269,6 ± 67,54 (107,5-396,7)	de la Casa- Resino <i>et al.</i> , 2014
	2011 (n=22)	Cáceres, España (cerca de vertedero)	386,9 ± 50,21 (329,0 – 499)	
	2011 (n=10)	Navalmoral de la Mata, Cáceres, España (zona agrícola y vertedero)	388,4 ± 22,55 (292,0 -366,9)	
19-56 días	2006	Kłopot, SO Polonia	25,26 ± 2,12	Kamiński <i>et</i> <i>al.</i> , 2008
		Cecenowo, N Polonia	29,41 ± 2,39	
		Czarnowo, SOPolonia	31,88 ± 8,07	
		Glogów, SO Polonia	34,46 ± 2,12	
14-59 días	2005, 2006 y 2007 (n=48)	Prados de Odra,Kłopot, SO Polonia	26,03 ± 20,19	
20-50 días	2005, 2006 y 2007 (n=45)	Cecenowo,Pomerania, N Polonia	37,20 ± 7,44	Kamiński <i>et</i> <i>al.</i> , 2009
17-59 días	2005, 2006 y 2007 (n=56)	Zielona Góra, SO Polonia	32,42 ± 19,13	
18-62 días	2005, 2006 y 2007 (n=37)	Glogów, (próximo a fundición de cobre), Polonia	29,54 ± 16,37	

**Tabla 10.** Referencias bibliográficas de **zinc** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (mg/L)	Autores
Pollos	1998 (n=30)	Aznalcóllar, Sevilla, España	1,90 (0,80-2,80)	Benito <i>et al.</i> , 1999
	2000 (n=20)	Cáceres, España	2,80 ± 5,0 (1,80-3,80)	
24-59 días	2000 (n=32)	Sevilla, España	2,90 ± 0,40 (2,10-3,70)	Baos <i>et al.</i> , 2006a
	1999 (n=64)		3,26 ± 9,60 (1,24-5250)	
media de edad: 52 días	2000 (n=39)	P. N. Doñana, Sevilla, España	2,76 ± 4,6 (1,50-3,70)	Baos <i>et al.</i> , 2006b
	2001 (n=64)		1,85 ± 3,30 (1,24-2,67)	
	2002 (n=91)		3,180 ± 3,70 (2,13-4,25)	
3-6 semanas	2011 (n=27)	Los Llanos de Cáceres y Sierra de Fuentes, Cáceres, España (ZEPA)	2,08 ± 5,23 (1,32-3,52)	de la Casa-Resino <i>et al.</i> , 2014
	2011 (n=22)	Cáceres, España (cerca de vertedero)	2,31 ± 2,95 (1,85-2,72)	
	2011 (n=10)	Navalmoral de la Mata, Cáceres, España (zona agrícola y vertedero)	2,81 ± 2,40 (2,54-3,24)	
35 días (media)	2005, 2006 (n=14)	Colonia próxima a fundición de cobre, Polonia	16,60 ± 2,20	Kulczykowska <i>et al.</i> , 2007
32 días (media)	2005, 2006 (n=14)	Kłopot, Polonia	9,38 ± 1,27	
19-56 días	2006	Kłopot, SO Polonia	6,87 ± 4,87	Kamiński <i>et al.</i> , 2008
		Cecenowo, N Polonia	9,63 ± 0,31	
		Czarnowo, SOPolonia	10,15 ± 0,30	
		Glogów, SO Polonia	9,66 ± 0,27	

**Tabla 11.** Referencias bibliográficas de **manganeso** en sangre de cigüeña blanca.

Edad	Año (n)	Localización	Media ± DE (Mín.-Máx.) (µg/L)	Autores
19-56 días	2006	Kłopot, SO Polonia	38,19 ± 9,14	Kamiński, <i>et al.</i> , 2008
		Cecenowo, N Polonia	42,19 ± 6,63	
		Czarnowo, SO Polonia	37,78 ± 7,67	
		Glogów, SO Polonia	47,61 ± 4,88	
14-59 días	2005, 2006 y 2007 (n=48)	Prados de Odra, Kłopot, SO Polonia	42,83 ± 8,51	
20-50 días	2005, 2006 y 2007 (n=45)	Cecenowo, Pomerania, N Polonia	47,60 ± 6,07	Kamiński, <i>et al.</i> , 2009
17-59 días	2005, 2006 y 2007 (n=56)	Zielona Góra, SO Polonia	44,42 ± 7,16	
18-62 días	2005, 2006 y 2007 (n=37)	Glogów, (próximo a fundición de cobre), Polonia	49,27 ± 3,74	

4. Parámetros bioquímicos y hematológicos en cigüeña blanca

La función de la sangre como vehículo de transporte y distribución de contaminantes hace que la sangre sea una muestra adecuada y útil para estudiar los contaminantes en vertebrados (Maceda-Veiga *et al.*, 2015). El análisis hematológico y las pruebas bioquímicas son utilizadas en medicina veterinaria de aves domésticas desde hace décadas, principalmente por su utilidad e importancia en el diagnóstico de enfermedades (Dolka *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2016; Harr, 2002; Lanzarot *et al.*, 2005; Lumeij, 1994a; Mostaghni *et al.*, 2005; Muriel *et al.*, 2013; Polo *et al.*, 1994). Sin embargo, si hay una gran cantidad de investigación y literatura sobre la hematología y química clínica de las aves domésticas la información es menos abundante en algunas especies de aves silvestres (Mostaghni *et al.*, 2005) y no es comparable con la riqueza del conocimiento existente en los seres humanos y animales domésticos. En Ecotoxicología, la hematología y los parámetros bioquímicos de las aves silvestres tienen su utilidad no solo como un método para apreciar la salud de un individuo o población, ya que nos permite evaluar la exposición a tóxicos y monitorizar contaminantes (Lanzarot *et al.*, 2005). La lista de parámetros sanguíneos potencialmente útiles en el monitoreo de la vida silvestre es así casi tan larga como la cantidad de componentes sanguíneos existentes, sean hematológicos o bioquímicos (Maceda-Veiga *et al.*, 2015). Como ejemplo, la determinación de la actividad de algunas enzimas plasmáticas puede servir como un



“índice” indirecto, un predictor de la exposición y acumulación de contaminantes en aves silvestres (Dieter, 1975; Pain, 1989; Sonne *et al.*, 2012).

Para interpretar correctamente los resultados hematológicos y bioquímicos es necesario conocer valores de referencia de los parámetros a analizar, así como conocer enfermedades que pueden conducir a un cambio (Campbell, 2012). Para obtener intervalos de referencia del análisis bioquímico y hematológico para una determinada especie de ave silvestre es importante tener en cuenta que estos valores dependen obviamente de factores fisiológicos (especie, edad, sexo, estado reproductivo, eventuales procesos patológicos), factores ambientales (la temperatura, fotoperíodo, época del año, hora de la colecta, dieta), factores dependientes de la toma de muestra (manipulación del animal y stress asociado, transporte y almacenamiento de la muestra), y de los métodos de determinación laboratorial (Campbell, 2012; Doneley, 2007; Franson *et al.*, 1985; Han *et al.*, 2016; Jerzak *et al.*, 2010; Kamiński *et al.*, 2014; Lanzarot *et al.*, 2005; Nazifi *et al.*, 2012; Plaza y Lambertucci, 2018). En comparación con los mamíferos, en aves hay diferencias fisiológicas y anatómicas que requieren conocimiento desde la hora de la colecta de sangre hasta la interpretación del análisis; por ejemplo, las muestras de plasma de aves tienen frecuentemente un color amarillo que se debe a la presencia de pigmentos carotenoides y que es un hallazgo perfectamente normal (Harr, 2002) que no interfiere con el análisis bioquímico.

En conclusión, es esencial estudiar diferencias en los valores bioquímicos y hematológicos debido a efectos fisiológicos (Beeby, 2001; de le Court *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2016) y otros, ya que en la cigüeña blanca hay pocas referencias de valores medios de parámetros bioquímicos y hematológicos, principalmente con relación a la edad y al sexo.

4.1. Bioquímica clínica

Según Kerr (2002), para interpretar el análisis bioquímico es útil e importante saber por qué encontramos una determinada sustancia en plasma, su función principal, si es constituyente del plasma (ej. albumina y electrolitos) o simplemente es transportada por él (ej. glucosa), si es un metabolito (ej. ácido úrico, urea) o está en el plasma “accidentalmente” (como la mayoría de las enzimas). La bioquímica clínica determina grupos específicos de sustancias químicas en el plasma e interpreta los resultados obtenidos, pudiendo dividir esos grupos en: (1) enzimas; (2) metabolitos; (3) electrolitos; y (4) minerales (Doneley, 2007).

4.2. Enzimas más utilizadas en la bioquímica clínica de aves

La distribución de varias enzimas es marcadamente diferente entre los órganos y las especies animales (Lumeij, 2008). Las enzimas encontradas en plasma pueden ser específicas de un tipo de célula o encontrarse simultáneamente en diferentes tipos de células (Evans, 2009). Cuando hay un cambio o una lesión en las células las enzimas



suelen ser liberadas y se pueden determinar en suero o plasma (Hochleithner, 1994). Algunas enzimas aparecen naturalmente en el citoplasma de las células (ej. alanina transferasa [ALT], lactato deshidrogenase [LDH]), otras en la mitocondria (ej. aspartato aminotransferasa [AST]), núcleo y membrana celular (fosfatasa alcalina [ALP]) (Lumeij, 2008, 2009). Las enzimas citoplasmáticas son liberadas en el plasma cuando hay degeneración de las células, pero las enzimas contenidas en las mitocondrias solo son liberadas cuando hay necrosis de las células (Lumeij, 1994a). El incremento de una determinada enzima en plasma es sobre todo dependiente de la distribución de la misma en los diversos órganos y de su tiempo medio de vida en plasma. La elevación de la concentración o actividad de una enzima, en general, es una medida de la reciente exposición de un órgano a un daño (Lumeij, 1994a); como ejemplo, el aumento de las enzimas AST y ALT en plasma o suero son indicadores de lesión hepática en mamíferos, por lo que estas enzimas son biomarcadores de lesión hepática en ellos (DiCaprio, 2006). Sin embargo, la disminución de la actividad de algunas enzimas puede también tener un valor diagnóstico, como es el caso de la disminución de la actividad colinesterasa en plasma debido a la intoxicación por pesticidas organofosforados y carbamatos (Lumeij, 1994a). Varias enzimas son útiles en estudios ecotoxicológicos para medir lesión celular, inducción enzimática y activación o inhibición (Evans, 2009), **Tabla 12**.

Tabla 12. Principales enzimas plasmáticas en aves, su presencia en los tejidos, especificidad e interpretación. Adaptada de: Batista (2012); Campbell, (2012); Doneley (2007); Gard y Hooper (1993); Harr (2002); Hochleithner (1994); Lumeij (2008); Melancon (2003); Ruíz-Rodríguez, (2013); Rosenthal (2019).

Enzima	Localización en los Tejidos	Especificidad Sensibilidad	Interpretación y significado clínico
AST (Aspartato aminotransferasa)	En la mitocondria de las células del hígado, músculo esquelético y cardíaco, riñón y cerebro.	Es sensible pero no es específico de daño hepatocelular	Elevaciones > 800 U/L sugieren lesión hepática. Puede existir incremento relacionado con hemólisis o daño muscular.
ALT (alanina aminotransferasa)	En el citoplasma de células hepáticas, riñón y otros tejidos.	Al contrario de los mamíferos, en aves no es específica para daño hepatocelular	Alteraciones consideradas poco útiles para la evaluación de lesión hepática, pero de difícil interpretación en aves. Incrementa con glomerulonefritis.
GGT (Gamma glutamiltransferasa)	En la membrana celular de varias células de sistema biliar, del riñón, intestino y cerebro.	No específica de daño hepatocelular en aves.	Aumenta en condiciones de colestasis y trastornos biliares, incluyendo carcinoma hepatobiliar.

**Tabla 12** (continuación). Principales enzimas plasmáticas en aves

Enzima	Localización en los Tejidos	Especificidad Sensibilidad	Interpretación y significado clínico
ChE (Colinesterasas)	Varias enzimas producidas en el hígado.	Acetilcolinesterasa (AChE) presente en el tejido cerebral. Butirilcolinesterasa (BChE) presente en el plasma.	Actividad disminuida en la sangre, plasma o cerebro puede ser indicativo de la exposición a plaguicidas carbamatos u organofosforados.
CK (Creatina quinasa)	Citoplasma de células musculares.	Específica del músculo.	Valores entre 100-500 UI/L. Incremento: necrosis muscular, convulsiones, inyección intramuscular, deficiencia de vitamina E y selenio e intoxicación por plomo.
LDH (Lactato deshidrogenasa)	En aves, diversas isoenzimas LDH son encontradas en muchos tejidos y en laboratorio no son diferenciadas de rutina.	No es una enzima específica de ningún tejido ni sensible para evaluar función hepática.	Una actividad aumentada con un valor de CK normal es sugestiva de daño hepatocelular. La actividad plasmática LDH ha sido relacionada con la concentración de metales.
ALP (Fosfatasa Alcalina)	Presente en la membrana celular del epitelio intestinal, renal, en los osteoblastos y en menor grado en el hígado, cerebro y músculo esquelético.	No es específica de ningún tejido.	Elevaciones marcadas en aves se creen ser específicos de la isoenzima con actividad osteoblástica del hueso, asociada con el crecimiento, osteomielitis, hiperparatiroidismo secundario, trauma y neoplasia óseas.

4.3. Metabolitos

Los metabolitos plasmáticos relacionados con la degradación de los lípidos (triglicéridos) y las proteínas (ácido úrico, urea) pueden ser relacionados con el estado fisiológico del ave (Jerzak *et al.*, 2010).

4.3.1. Ácidos biliares

Los ácidos biliares plasmáticos (AB) y sus sales se forman en el hígado a partir del colesterol y se excretan en el intestino, donde ayudan en la digestión de lípidos (Lumeij, 2008). Es posible que un animal tenga una actividad enzimática plasmática normal y aun



así tenga una disminución significativa de la función hepática (Battison *et al.*, 1996). La bilirrubina y los AB se han usado como un medio para detectar la función hepatobiliar en mamíferos, pero en aves la bilirrubina es de escaso uso diagnóstico porque sus valores son extremadamente bajos o indetectables en aves normales (Battison *et al.*, 1996). En las aves, el pigmento biliar primario es la biliverdina, ya que la enzima que reduce la biliverdina está ausente y no se transforma en bilirrubina, que no se detecta en el plasma (Batista, 2012).

En aves, las elevaciones séricas de AB están correlacionadas con enfermedad hepática, y su dosificación es un indicador específico y sensible de la función hepática (Battison *et al.*, 1996; Campbell, 2012; Lumeij, 2008). Algunos autores refieren que los valores de AB pueden aumentar en aves sanas hasta 4,5 veces más que el rango normal en el período postprandial (Battison *et al.*, 1996).

4.3.2. Ácido úrico

En comparación con mamíferos, debido a diferencias anatómicas y fisiológicas, existe la necesidad del uso de diferentes analitos para evaluar la función renal en aves (como es el caso del ácido úrico versus la urea en mamíferos) (Harr, 2002; Hochleithner, 1994). El ácido úrico es el principal metabolito de amonio resultante del catabolismo de las proteínas excretado en aves (Batista, 2012; Lumeij, 2008). La síntesis de ácido úrico, a partir de las purinas, se produce parcialmente en el hígado y el riñón (Harr, 2002). Una concentración de ácido úrico superior a 13 mg/dl (750 $\mu\text{mol/L}$) sugiere deterioro de la función renal por diversas causas, por ejemplo, por exposición al Pb (Campbell, 2012; Jenkins, 1994). Altas concentraciones de ácido úrico en plasma se pueden encontrar en los trastornos de la función renal (Lumeij, 2008). El ácido úrico es útil para evaluar función renal, pero es poco sensible una vez que sus niveles sanguíneos pueden no aumentar hasta que hay una pérdida de 75% de la función renal (Campbell, 2012). Los niveles de este metabolito son influenciados por la especie del ave, su edad, y por la dieta; en las aves carnívoras elevaciones significativas de ácido úrico pueden ser posteriores a la ingestión de alimentos ricos en proteínas y no indicar específicamente un problema renal (Campbell, 2012). Una disminución de sus niveles se relaciona con enfermedad hepática severa (Ruíz-Rodríguez, 2013). En un estudio en cigüeña blanca los niveles de ácido úrico fueron menores en adultos que en juveniles (Alonso *et al.*, 1991), y también en otras especies hay referencias a niveles de ácido úrico más elevados en aves más jóvenes (Campbell, 2012; de le Court *et al.*, 1995).

4.3.3. Urea

Los niveles de urea, así como de creatinina, son normalmente bajos en aves (Harr, 2002). En aves la urea no es indicadora de lesión renal, pues es influenciada por el perfil de hidratación del paciente (Hochleithner, 1994). Según Alonso *et al.* (1991) los niveles de urea de pollos y juveniles de cigüeña blanca son semejantes.



4.4. Proteínas totales y albúmina

En general, las aves presentan valores de proteínas totales plasmáticas menores que los mamíferos, de aproximadamente la mitad del valor (Batista, 2012), generalmente desde 25 a 45 g/L (Campbell, 2012). Las proteínas plasmáticas incluyen: albúminas, globulinas, proteínas de transporte, hormonas proteicas, fibrinógeno y otros factores de coagulación (Campbell, 2012; Kerr, 2002). Las proteínas plasmáticas son esenciales en la manutención de la presión oncótica y como tampón para mantener el pH de la sangre en un rango de valores normales (Jenkins, 1994). La hipoproteinemia puede ser resultado de la disminución en la síntesis de proteínas, hepatopatías crónicas, enfermedad renal, hemorragia, mala absorción, desnutrición, enfermedad intestinal (enteritis crónicas), quemaduras (Hochleithner, 1994; Kerr, 2002; Ruíz-Rodríguez, 2013). La hiperproteinemia ocurre en aves deshidratadas, con enfermedades crónicas e inmunomediadas, inflamación crónica con incremento de las fracciones proteicas de gammaglobulinas y naturalmente en aves en puesta (Kerr, 2002; Landinez, 2010; Ruíz-Rodríguez, 2013). De acuerdo con Alonso *et al.* (1991), los niveles de proteínas totales en plasma de cigüeña blanca son similares entre aves adultas y juveniles y comparables al intervalo de referencia de otras especies de aves.

La albúmina es producida en el hígado, siendo la mayor fracción proteica en aves, representando 40-50% del total de las proteínas plasmáticas. Sirve tanto de proteína de transporte (de aniones, cationes, hormonas) como de depósito proteico cuando hay menor ingestión de proteínas (Jenkins, 1994; Landinez, 2010). La albumina puede ser utilizada para el diagnóstico de enfermedades hepáticas, estando los valores normales en aves según Landinez (2010) entre 16 a 20 g/L (Landinez, 2010). Como la albúmina es una de las proteínas de menores dimensiones en el plasma tiende a ser de las primeras proteínas a disminuir cuando hay pérdidas, llevando a hipoalbuminemia (Kerr, 2002) que afecta las concentraciones de los aniones, cationes y hormonas que transporta (Landinez, 2010).

4.5. Lípidos

Los lípidos incluyen fosfolípidos, ácidos grasos, (glicerol), triglicéridos y el colesterol (Jenkins, 1994). Los triglicéridos representan la principal fuente de energía y almacenamiento de los lípidos (Batista, 2012), son obtenidos directamente de la dieta o sintetizados en la mucosa intestinal y en el hígado por la digestión de las grasas. El colesterol y los triglicéridos no son referidos como útiles en aves silvestres (Batista, 2012). Sabemos que la concentración en suero de los lípidos aumenta *postprandial*, pero en aves silvestres cuando se hace la recogida de la muestra no siempre es posible confirmar si están en ayuno o no. Los valores de colesterol en aves carnívoras son superiores en comparación con los valores de aves frugívoras o granívoras (Jenkins, 1994). De acuerdo con Thrall (2004) las concentraciones plasmáticas de colesterol, en la mayoría de las especies, se encuentran en el intervalo de 100-250 mg/dL (2,59-6,47 mmol/L). Hipocolesterolemia ocurre en casos de enfermedad hepática terminal, mala digestión o absorción y hambre. Alonso *et al.* (1991) en cigüeña blanca encontraron valores de colesterol similares entre aves adultas y juveniles y valores de triglicéridos más



elevados de acuerdo con la edad. De le Court *et al.* (1995) encontraron valores de triglicéridos más altos en hembras de espátula común (*Platalea leucorodia*).

4.6. Glucosa

En aves la mayoría de la comida ingerida es utilizada como fuente de energía (Jenkins, 1994). Las aves exhiben una concentración plasmática de glucosa más elevada que los mamíferos. Situaciones que conduzcan al incremento de catecolaminas, como el stress (el stress de manipulación), ejercicio o alteraciones de temperatura radicales, llevan a una hiperglicemia, caracterizada en la mayoría de las aves, por valores mayores de 500 mg/dL (27,76 mmol/L), en cuanto que la *Diabetes mellitus (DM)* si relaciona con valores mayores de 700 mg/dl (38,86 mmol/L) (Campbell, 2012). Es considerada hipoglicemia, en la mayoría de las aves, valores de glicemia menores de 200 mg/dl (Campbell, 2012).

4.7. Electrólitos

Sodio (Na^+), potasio (K^+), cloro (Cl^-) son los electrólitos más importantes para el mantenimiento de la osmolaridad plasmática como en otros animales (Kerr, 2002; Rosenthal, 2019). Los tres iones (Na^+ , K^+ , Cl^-) están distribuidos en el plasma, fluido intersticial y linfa (Kerr, 2002). Normalmente los animales tienen una gran capacidad de excreción de estos electrólitos y, en general, disminuciones en sus niveles se relacionan con pérdidas anormales de fluidos. El riñón de las aves tiene la capacidad de reabsorber hasta 99% del Na^+ filtrado, principalmente en el túbulo proximal. Según Jenkins (1994) en aves los valores normales de Na^+ varían entre 130-155 mEq/L y de K^+ entre 2,5-4,5 mEq/L. El Cl^- , en conjunto con el Na^+ , es un componente activo en el mantenimiento de la osmolaridad plasmática. Sus niveles se mantienen en el rango 100 a 120 mEq/L, siendo que en aves tanto la hipercloremia como la hipocloremia han sido raramente reportadas (Campbell, 2012). El K^+ es el principal catión intracelular, por eso su concentración plasmática puede aumentar cuando hay hemolisis (Campbell, 2012). El rango de K^+ en aves es de 2.0 mEq/L a 4 mEq/L. Hiperpotasemia es asociada principalmente a fallo renal e hipopotasemia a anorexia prolongada y diarrea (Campbell, 2012).

4.8. Minerales

Los minerales son importantes en la contracción muscular y en algunas señales del sistema nervioso (Kerr, 2002). Al contrario de los electrolitos, las concentraciones en la dieta de calcio (Ca) y fósforo (P) deben ser las correctas para que los animales consigan mantener el equilibrio de estos minerales (Kerr, 2002). Los niveles de minerales plasmáticos pueden ser útiles para evaluar el estado de nutrición de las aves (Stout *et al.*, 2010).

El Ca es muy importante en la transmisión neuro-muscular, siendo un componente principal del hueso (Kerr, 2002). Aproximadamente el 50% del Ca plasmático es



transportado unido a albumina y el resto está libre en el plasma, por eso hay que tener en consideración que su concentración plasmática es afectada por los niveles de albumina (Campbell, 2012). Los niveles normales de Ca en la mayoría de las especies aviares están en el rango 8 a 15 mg/dl (2-3 mmol/L) (Jenkins, 1994). Las hembras en puesta tienen niveles de Ca plasmático superiores, comparados con otros estados reproductivos, pudiendo llegar hasta 20-30 mg/dl (5-7,5 mmol/L) (Jenkins, 1994).

El P y el magnesio (Mg) son iones intracelulares. El P inorgánico es un componente importante de los huesos y es de gran importancia en muchas vías metabólicas, en particular cuando están implicados compuestos de alta energía (Kerr, 2002). En aves con enfermedad renal severa puede ocurrir hiperfosfatemia (P plasmático mayor de 7 mg/dL (2,26 mmol/L) (Campbell, 2012; Ruíz-Rodríguez, 2013). La hipofosfatemia ocurre con niveles inferiores a 5 mg/dl (1,61 mmol/L) (Campbell, 2012).

De los estudios publicados con valores de parámetros bioquímicos en el género *Ciconia*, recogidos en la **Tabla 13**, solo 2 refieren el sexo, uno en pollos (Jerzak *et al.*, 2010) y otro en pollos y aves adultas (Han *et al.*, 2016).

4.9. Parámetros hematológicos (hematocrito y hemoglobina)

Al igual que con los valores bioquímicos, los valores hematológicos de aves sanas se pueden utilizar para establecer rangos de referencia que posteriormente se pueden usar como herramientas de diagnóstico para determinar la salud de individuos que viven en libertad, en Veterinaria, estudios de Ecología, Ecotoxicología, entre otros (Kamiński *et al.*, 2014; Maceda-Veiga *et al.*, 2015). Los parámetros hematológicos han sido utilizados en varias especies de aves como biomarcadores de contaminación metálica (Geens *et al.*, 2010; Hoffman *et al.*, 2003).

De forma similar a los mamíferos, distintos parámetros son utilizados en hematología aviar: el análisis de la serie roja (hematocrito [Hct], recuento de glóbulos rojos, determinación de hemoglobina [Hb], índices eritrocitarios); evaluación de la serie blanca (recuento total y diferencial de leucocitos en: heterófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos); recuento de trombocitos; y la observación del frotis sanguíneo. Entre estos parámetros la concentración de Hb y el valor del Hct han sido los más asociados con la contaminación metálica y utilizados como biomarcadores (Berglund *et al.*, 2010; Binkowski y Sawicka-Kapusta, 2015; Geens *et al.*, 2010; Martínez-Haro *et al.*, 2011; Pain, 1989; Richardson, 2006).

Por eso, y por la escasa cantidad de muestra necesaria su rápido cálculo y determinación, y bajo coste, en esta tesis hemos elegido estos dos parámetros hematológicos (Hct y Hb).

**Tabla 13.** Estudios publicados con valores de enzimas, electrolitos, metabolitos y minerales en *Ciconia ciconia*, o en otras especies del género *Ciconia*.

Edad	Parámetros bioquímicos analizados	Autores
Adultas	PT, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, urea	Alonso <i>et al.</i> , 1991
>1 año	AST, GGT, LDH, ALP, PT, ácidos biliares	Szabó <i>et al.</i> , 2010
Pollos <1 año; adultas >1 año (<i>Ciconia boyciana</i>)	PT, albúmina, globulina, AST, ALT, urea, creatinina, colesterol total, glucosa, triglicéridos, bilirrubina total, CPK, amilasa, LDH, ácido úrico, ALP, GGT, Na, K, P, Cl, Ca	Han <i>et al.</i> , 2016*
15-68 días	ALPK, AST, ALT, PT, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, urea	Puerta <i>et al.</i> , 1989b
17-32 días; 44-56 días	AST, CPK, PT, albúmina, ácido úrico, colesterol, urea, triglicéridos, glucosa, K	Montesinos <i>et al.</i> , 1997
35-55 días	AST, CPK, GGT, LDH, PT, albúmina, colesterol, triglicéridos, urea, glucosa, Ca, P, Na, Mg	Jiménez <i>et al.</i> , 2006
19-52 días	Na, K, Ca, Mg	Kamiński <i>et al.</i> , 2009
20-70 días	AST, ALT, CPK, GGT, LDH, ALPK, PT, ácidos biliares, glucosa, triglicéridos, ácido úrico, creatinina, Ca, P	Batista, 2012
Pollos	PT, ácido úrico, urea, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, ALT, AST	Jerzak <i>et al.</i> , 2010*
25-53 días (<i>Ciconia nigra</i>)	AST, BChE, CPK, LDH, ALPK, PT, albúmina, ácidos biliares, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, urea, glucosa, Ca, P, Na	Lanzarot <i>et al.</i> , 2005

*Estudio que hace distinción entre hembras y machos.

El volumen total de sangre en aves varía entre 5% a 15% del peso total del animal (Jenkins, 1994). El valor Hct, o *packed cell volum PCV* en inglés, es el porcentaje de volumen que ocupa la fracción de glóbulos rojos con relación al volumen total de sangre, siendo calculado después de la centrifugación del tubo de microhematocrito (Samour, 2006). Al estimar el número de glóbulos rojos de una muestra de sangre, el Hct es un marcador sencillo y fiable de la capacidad de transporte de oxígeno de los glóbulos rojos (Maceda-Veiga *et al.*, 2015). El valor de Hct en las aves varía entre 35 y 55 por ciento (Campbell, 1994) y depende de: la variación en el volumen plasmático; la tasa de producción y destrucción de eritrocitos (un proceso en el que pueden estar implicadas enfermedades hemolíticas o parásitos sanguíneos); grado de hidratación; toxinas; pérdida directa de sangre como resultado de ectoparásitos y/o trauma (Kamiński *et al.*, 2014). En aves un Hct inferior al 35% es indicativo de anemia y superior al 55% sugiere



deshidratación o policitemia (Campbell, 1995). Metales como el Cd y el Pb pueden bajar los valores de Hct y conducir a anemia (Geens *et al.*, 2010). La edad es uno de los factores fisiológicos que más influyen en el Hct (Dolka *et al.*, 2014; Kamiński *et al.*, 2014; Montesinos *et al.*, 1997). En *Ciconia boyciana*, las aves con más de 1 año presentaron valores de Hct más elevados estadísticamente en comparación con aves con menos de 1 año (Han *et al.*, 2016). En cigüeña negra (*Ciconia nigra*) y cigüeña blanca se ha indicado que el Hct aumenta con la edad de los pollos (Kamiński *et al.*, 2014; Lanzarot *et al.*, 2005; Montesinos *et al.*, 1997). Kamiński *et al.* (2014) identificaron diferencias significativas en el valor de Hct y de Hb de pollos de cigüeña blanca de acuerdo con la estación del año y valores más elevados en pollos hembras que en machos. Para los mismos autores, además de la edad y el sexo, otros factores demostraron mayor influencia en el Hct y Hb, como la localización geográfica y el año de colecta de muestra.

En aves, la estimación de la Hb se ve obstaculizada por la presencia de núcleos en los eritrocitos, que aparecen en el medio de medición colorimétrica, para lo que es necesaria la lisis de los eritrocitos (Samour, 2006). Se considera que valores de Hb inferiores a la concentración media sanguínea son indicativos de que el ave está con anemia. Valores de Hb elevados, acompañados de elevaciones en los niveles de urea y PT, se pueden relacionar con deshidratación. Los valores para la concentración total de Hb varían de acuerdo con la especie de ave: en pollos de cigüeña negra con 15-55 días la concentración de Hb es de $111,0 \pm 6,0$ g/L (Puerta *et al.*, 1989) y en pollos de cigüeña blanca con 44-56 días es de $126,5 \pm 7,9$ g/L (Montesinos *et al.*, 1997). De forma similar a lo indicado para el Hct, los valores de Hb en aves suelen ser mayores en adultos que en pollos, lo que puede ser explicada por una mayor necesidad del oxígeno debido a las exigencias de la adaptación al vuelo (Batista, 2012). Han *et al.* (2016) en *Ciconia boyciana* encontraron valores de Hb mayores en aves adultas (>1 de año) que en más jóvenes (< 1 año), con significancia estadística. En relación, a la concentración de Hb entre machos y hembras de aves silvestres algunos estudios no evidencian diferencias (Batista, 2012); sin embargo, Kamiński *et al.* (2014) en un estudio con pollos de cigüeña blanca, encontraron valores de Hb más elevados en hembras.

REFERENCIAS

- Alaya-Ltifi L., Hayder-Benyahya N., Selmi S. (2015). Condition and health of Rufous Bush Robin (*Cercotrichas galactotes*) nestlings in a polluted oasis habitat in Southern Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 732–737.
- Alonso J.C., Huecas V., Alonso J.A., Abelenda M., Muñoz-Pulido R., Puerta M.L. (1991). Hematology and blood chemistry of adult white storks (*Ciconia ciconia*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 98, 395–397.
- Álvarez C.R., Moreno M.J., Alonso L.L., Gómara B., Bernardo F.G., Martín-Doimeadios R.R., González M.J. (2013). Mercury, methylmercury, and selenium in blood of bird species from Doñana National Park (Southwestern Spain) after a mining accident. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5361–5372.



- ATSDR Agency for toxic substances and disease registry (2019). Toxic Substances Portal: Chromium. Recuperado el 29/08/2019 de <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=17>.
- Baos R., Bla J., Bortolotti G.R., Marchant T.A., Hiraldo F. (2006a). Adrenocortical response to stress and thyroid hormone status in free-living nestling White storks (*Ciconia ciconia*) exposed to heavy metal and arsenic contamination. *Environ. Health Perspect.* 114, 1497–1501.
- Baos R., Jovani R., Pastor N., Tella J.L., Jiménez B., Gómez G., González M.J., Hiraldo F. (2006b). Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2794–2803.
- Baos R., Jovani R., Forero M.G., Tella J.L., Gómez G., Jiménez B., González M.J., Hiraldo F. (2006c). Relationships between T-cell-mediated immune response and Pb, Zn, Cu, Cd, and As concentrations in blood of nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from Doñana (southwestern Spain) after the Aznalcóllar toxic spill. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1153–1159.
- Baos R., Jovani R., Serrano D., Tella J.L., Hiraldo F. (2012). Developmental exposure to a toxic spill compromises long-term reproductive performance in a wild, long-lived bird: the white stork (*Ciconia ciconia*). *PLoS ONE* 7, e34716-.
- Batista L.S.G. (2012). Hematología e Bioquímica sanguínea em jovens de cegonha-branca (*Ciconia ciconia*) no estado selvagem. Tese de Master. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Recuperado el 23/03/2018 de <http://hdl.handle.net/10400.5/3842>.
- Battison A.L., Buckzowski S., Archer F.J. (1996). Plasma bile acid concentration in the cockatiel. *Can. Vet. J.* 37, 233–234.
- Beck M.L., Hopkins W.A., Hallagan J.J., Jackson B.P., Hawley D.M. (2014). Exposure to residual concentrations of elements from a remediated coal fly ash spill does not adversely influence stress and immune responses of nestling tree swallows. *Conserv. Physiol.* 2(1), cou018.
- Becker P.H. (2003). Biomonitoring with birds. En: Markert B.A, Breure A.M., Zechmeister H.G. (eds), Trace metals and other contaminants in the Environment. Elsevier, pp. 677–736.
- Beeby A. (2001). What do sentinels stand for? *Environ. Pollut.* 112, 285–298.
- Benito V., Devesa V., Muñoz O., Suñer M.A., Montoro R., Baos R., Hiraldo F., Ferrer M., Fernández M., González, M.J. (1999). Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci. Total Environ.* 242, 309–323.
- Berglund Å.M., Ingvarsson P.K., Danielsson H., Nyholm N.E.I. (2010). Lead exposure and biological effects in pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) before and after the closure of a lead mine in northern Sweden. *Environ. Pollut* 158(5), 1368-1375.
- Bernard A. (2008). Biomarkers of metal toxicity in population studies: research potential and interpretation issues. *J. Toxicol. Environ. Health A* 71, 1259–1265.



- Bianchi N., Ancora S., di Fazio N., Leonzio C. (2008). Cadmium, lead, and mercury levels in feathers of small passerine birds: noninvasive sampling strategy. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2064-2070.
- Binkowski Ł.J., Meissner W. (2013). Levels of metals in blood samples from Mallards (*Anas platyrhynchos*) from urban areas in Poland. *Environ. Pollut.* 178, 336–342.
- Binkowski Ł.J., Sawicka-Kapusta K. (2015). Lead poisoning and its in vivo biomarkers in Mallard and Coot from two hunting activity areas in Poland. *Chemosphere* 127, 101–108.
- Blanco G., Frías O., Jiménez B., Gómez G. (2003). Factors influencing variability and potential uptake routes of heavy metals in black kites exposed to emissions from a solid-waste incinerator. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2711–2718.
- Blázquez E., Aguirre J., Martínez-Haro M., Mateo R., Jiménez B. (2006). The use of White stork (*Ciconia ciconia*) nestlings in a biomonitoring programme for organochlorines through the region of Madrid (Spain). *Organohalogen Compd.* 68, 2081–2084.
- Buekers J., Redeker E.S., Smolders E. (2009). Lead toxicity to wildlife: derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Sci. Total Environ.* 407, 3431–3438.
- Burger J. (1993). Metals in avian feathers: Bioindicators of environmental pollution. *Rev. Env. Toxicol.* 5, 203–311.
- Burger J. (1995). A risk assessment for lead in birds. *J. Toxicol. Environ. Health Part A: Curr. Issues* 45, 369–396.
- Burger J. (2008). Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci. Total Environ.* 389, 37–45.
- Burger J., Gochfeld M. (1997). Risk, mercury levels, and birds: relating adverse laboratory effects to field biomonitoring. *Environ. Res.* 75, 160–172.
- Burger J., Gochfeld M. (2001). On developing bioindicators for human and ecological health. *Environ. Monit. Assess.* 66, 23–46.
- Burger J., Fossi C., McClellan-Green P., Orlando E.F. (2007). Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environ. Res.* 104, 135–152.
- Campbell T.W. (1994). Hematology. En: Ritchie B.W., Harrison G.J, Harrison L.R. (eds). *Avian Medicine: principles and application*. Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida, pp. 176–198.
- Campbell T.W. (1995). *Avian hematology and cytology* (2a ed.). Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Campbell T.W. (2012). Clinical Chemistry of Birds. En: Thrall M.A., Weiser G. Allison R.W. (eds). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2a ed.). John Wiley Sons, Inc, pp. 582–598.
- Carneiro M., Colaço B., Brandão R., Ferreira C., Santos N., Soeiro V., Colaço A., Pires M.J., Oliveira P.A., Lavín, S. (2014). Biomonitoring of heavy metals (Cd, Hg, and Pb) and



- metalloid (As) with the portuguese common buzzard (*Buteo buteo*). *Environ. Monit. Assess.* 186, 7011–7021.
- de la Casa-Resino I. (2014). Nuevos horizontes en ecotoxicología: biomarcadores destructivos y no destructivos en codorniz (*Coturnix coturnix*) y cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*). Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Recuperado el 15/01/2019 de <http://dehesa.unex.es/handle/10662/2284>.
- de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Pérez-López M., Soler F. (2014). Breeding near a landfill may influence blood metals (Cd, Pb, Hg, Fe, Zn) and metalloids (Se, As) in white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings. *Ecotoxicology* 23, 1377–1386.
- de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Soler F., Pérez-López M. (2015). Biomarkers of oxidative status associated with metal pollution in the blood of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain. *Toxicol. Environ. Chem.* 97, 588–598.
- Castro I., Aboal J.R., Fernández J.A., Carballeira A. (2011). Use of raptors for biomonitoring of heavy metals: gender, age and tissue selection. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 347–351.
- Coeurdassier M., Fritsch C., Faivre B., Crini N., Scheifler R. (2012). Partitioning of Cd and Pb in the blood of European blackbirds (*Turdus merula*) from a smelter contaminated site and use for biomonitoring. *Chemosphere* 87, 1368–1373.
- Cotín J.M. (2012). Birds as bioindicators of pollution in aquatic and terrestrial environments. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Recuperado el 18/01/2018 de <http://hdl.handle.net/2445/35946>.
- de le Court C., Aguilera E., Recio F. (1995). Plasma chemistry values of free-living white spoonbills (*Platalea leucorodia*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 112(1), 137–141.
- Davidson T., Ke Q., Costa M.A.X. (2015). Selected molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenicity. En: Nordberg G., Fowler B., Nordberg M. (eds). *Handbook on the Toxicology of Metals* (4a ed.). Academic Press, pp. 173-196.
- DeCaprio A. (2006). Introduction to Toxicology Biomarkers. En: DeCaprio, A. (ed), *Toxicologic Biomarkers*. CRC Press, pp. 1–14.
- Del Lama S.N., Rocha C.D., Jardim W.F., Tsai J.-S., Frederick P.C. (2011). Sedentary nestlings of Wood Stork as monitors of mercury contamination in the gold mining region of the Brazilian Pantanal. *Environ. Res.* 111, 1091–1095.
- Dieter M.P. (1975). Further studies on the use of enzyme profiles to monitor residue accumulation in wildlife: plasma enzymes in starlings fed graded concentrations of Morsodren, DDE, Aroclor 1254 and malathion. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 3, 142–150.
- Dieter M.P., Perry M.C., Mulhern B.M. (1977). Lead and PCB's in canvasback ducks: relationship between enzyme levels and residues in blood. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 5, 1–13.
- Dobson W., Erikson K.M., Aschner M. (2004). Manganese neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012, 115–128.



- Dolka B., Włodarczyk R., Żbikowski A., Dolka I., Szeleszczuk P., Kluciński W. (2014). Hematological parameters in relation to age, sex and biochemical values for mute swans (*Cygnus olor*). *Vet. Res. Commun.* 38, 93–100.
- Doneley B. (2007). Biochemistries: What they do and don't do. En: Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association Conference Sydney, Australia, 2007. WSAVA, pp. 1537–1540.
- Eisler R. (1985a). Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review (Contaminant Hazard Reviews Report n° 2). U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. Recuperado el 20/02/2018 de https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_2_Cadmium.pdf.
- Eisler R. (1985b). Selenium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review (Contaminant Hazard Reviews Report n° 5). U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. Recuperado el 03/05/2018 de https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_5_Selenium.pdf.
- Eisler R. (1986). Chromium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review (Contaminant Hazard Reviews Report n° 6). U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. Recuperado el 20/02/2018 de https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_6_Chromium.pdf.
- Eisler R. (1987). Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review (Contaminant Hazard Reviews Report n° 10). U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. Recuperado el 20/02/2018 de https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_10_Mercury.pdf.
- Eisler R. (1988). Arsenic hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review (Contaminant Hazard Reviews Report n° 12). U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. Recuperado el 20/02/2018 de https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_12_Arsenic.pdf.
- Eisler R. (1993). Zinc hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review (Contaminant Hazard Reviews Report n° 26). U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. Recuperado el 11/11/2018 de https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_26_Zinc.pdf.
- Eisler R. (1998a). Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates (Contaminant Hazard Reviews Report n° 33). U.S. Department of the Interior, Geological Survey, Washington DC. Recuperado el 04/03/2018 de https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_33_Copper.pdf.
- Eisler R. (1998b). Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review (Contaminant Hazard Reviews Report n° 34). U.S. Geological Survey, Washington D.C. Recuperado el 04/03/2018 de https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_34_Nickel.pdf.
- Eisler R. (2004). Arsenic hazards to humans, plants, and animals from gold mining. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180: 133–165.
- Ensley S. (2004). Metals and Minerals- Arsenic. En: Plumlee, K.H. (ed), *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby, St. Louis, pp. 193–195.



- Espín S., Martínez-López E., Jiménez P., María-Mojica P., García-Fernández A.J. (2015). Delta-aminolevulinic acid dehydratase (deltaALAD) activity in four free-living bird species exposed to different levels of lead under natural conditions. *Env. Res* 137, 185–198.
- European Environment Agency (2019). Heavy metal emissions. Recuperado el 05/12/2020 de <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/eea32-heavy-metal-hm-emissions-1/assessment-10>.
- Evans G.O. (2009). General Enzymology. En: Evans, G.O. (ed), Animal clinical chemistry a practical guide for toxicologists and biomedical researchers. Taylor Francis Group, LLC, pp. 17–36.
- Evers D.C., Taylor K.M., Major A., Taylor R.J., Poppenga R.H., Scheuhammer A.M. (2003). Common loon eggs as indicators of methylmercury availability in North America. *Ecotoxicol.* 12, 69–81.
- Fedynich A.M., Ballard B.M., McBride T.J., Estrella J.A., Garvon J.M., Hooper M.J. (2007). Arsenic, cadmium, copper, lead, and selenium in migrating blue-winged teal (*Anas discors L.*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 662–666.
- Fisher I.J., Pain D.J., Thomas V.G. (2006). A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. *Biol. Conserv.* 131, 421–432.
- Fossi M.C. (1994). Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 102, 49-54.
- Franson J.C. (1996). Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. En: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (eds), Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 265–279.
- Franson J.C., Pain, D.J. (2011). Lead in birds. En: Beyer W.N., Meador J.P. (eds.), Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations (2a ed.). CRC Press Taylor Francis Group, Boca Raton, Florida, pp 563-593.
- Franson, J.C., Murray H.C., Bunck C. (1985). Enzyme activities in plasma, kidney, liver, and muscle of five avian species. *J. Wildl. Dis.* 21, 33–39.
- Furness R. (1993). Birds as monitors of pollutants. En: Furness R., Greenwood J. (eds.), Birds as monitors of environmental change. Chapman and Hall, London, pp. 86–131.
- Furness, R. (1996). Cadmium in birds. En: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (eds.), Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 389–404.
- Gallego-Rodríguez M.E.G., Hernández-Moreno D., Fidalgo-Álvarez L.E., Rigueiro L., López-Beceiro A., Soler F., Pérez-López M. (2007). Niveles de plomo y cadmio en tejido hepático de aves marinas afectadas por el accidente del “Prestige” en Galicia. *Ardeola* 54, 41–57.
- García-Fernández A.J., Sánchez-García J.A., Gómez-Zapata M., Luna A. (1996). Distribution of cadmium in blood and tissues of wild birds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 252–258.



- García-Fernández A.J., Romero D., Martínez-López E., Navas I., Pulido M., María-Mojica P. (2005). Environmental lead exposure in the European Kestrel (*Falco tinnunculus*) from Southeastern Spain: The influence of leaded gasoline regulations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74, 314–319.
- Gard N.W., Hooper M.J. (1993). Age-dependent changes in plasma and brain cholinesterase activities of eastern bluebirds and european starlings. *J. Wildl. Dis.* 29, 1–7.
- Garland, T. (2007). Arsenic. En: Gupta R.C. (ed), *Veterinary Toxicology* (2a ed.). Academic Press, Oxford, pp. 418–421.
- Geens A., Dauwe T., Bervoets L., Blust R., Eens M. (2010). Haematological status of wintering great tits (*Parus major*) along a metal pollution gradient. *Sci. Total Environ.* 408(5), 1174–1179.
- Gil F., Pla A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21, 245–255.
- Gilbert S. (2012). A small dose of metals or an introduction to the health effects of metals. En: Gilbert, S. (ed), *A Small Dose of Toxicology. The Health Effects of Common Chemicals*. Healthy World Press, Seattle. pp. 129–138.
- Gómara B., González M.J., Baos R., Hiraldo F., Abad E., Rivera J., Jiménez B. (2008). Unexpected high PCB and total DDT levels in the breeding population of Red Kite (*Milvus milvus*) from Doñana National Park, south-western Spain. *Environ. Int.* 34, 73–78.
- Gómez G., Baos R., Gómara B., Jiménez B., Benito V., Montoro R., Hiraldo F., González M.J. (2004). Influence of a mine tailing accident near Doñana National Park (Spain) on heavy metals and arsenic accumulation in 14 species of waterfowl (1998 to 2000). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 521–529.
- Gómez-Ramírez P., Martínez-López E., María-Mojica P., León-Ortega M., García-Fernández A.J. (2011). Blood lead levels and δ -ALAD inhibition in nestlings of Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) to assess lead exposure associated to an abandoned mining area. *Ecotoxicology* 20, 131–138.
- Goutner V., Becker P.H., Liordos V., Tsachalidis E.P. (2011). Mercury in White Stork *Ciconia ciconia* chick feathers from Northeastern Mediterranean areas in relation to age, brood size, and hatching order. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 327–336.
- Goyer R.A., Clarkson T.W. (1996). Toxic effects of metals. En: Klaassen, C.D. (ed), *Casarett Doull's Toxicol. Basic Sci. Poisons* (5a ed.). McGraw-Hill Health Prof. Div.
- Gupta R.C. (2007). Mercury. En: Gupta R.C. (ed), *Veterinary Toxicology* (2a ed.). Academic Press, Oxford, pp. 442–448.
- Gwaltney-Brant S. (2004). Lead. En: Plumlee, K.H. (ed), *Clinical Veterinary Toxicology*. Mosby, pp. 204–210.
- Hamilton S.J., Hoffman D.J. (2003). Trace element and nutrition interactions in fish and wildlife. En: Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A., Cairns J. (eds). *Handbook of Ecotoxicology* (2a ed.). Lewis Publishers, pp. 1197- 1200.



- Han J.I., Jang H.-J., Na K.-J. (2016). Hematologic and serum biochemical reference intervals of the Oriental white stork (*Ciconia boyciana*) and the application of an automatic hematologic analyzer. *J. Vet. Sci.* 17, 399–406.
- Harr K.E. (2002). Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Vet. Clin. Pathol.* 31, 140–151.
- Herzke D., Kallenborn R., Nygard T. (2002). Organochlorines in egg samples from Norwegian birds of prey: congener-, isomer- and enantiomer specific considerations. *Sci. Total Environ.* 291, 59–71.
- Hochleithner M. (1994). Biochemistries. En: Ritchie, B.W., Harrison, G.J. Harrison, L.R. (eds), *Avian Medicine: principles and application*. Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida, pp. 223–245.
- Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A. Jr, Cairns J. Jr. (2003). *Handbook of Ecotoxicology*, (2a ed.). J. Lewis Publishers.
- Honda K., Min B.Y., Tatsukawa R. (1986). Distribution of heavy metals and their age-related changes in the eastern great white egret, *Egretta alba modesta*, in Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15, 185–197.
- Hooser S.B. (2007a). Cadmium. En: Gupta R.C. (ed), *Veterinary Toxicology* (2a ed.). Academic Press, Oxford, pp. 422–424.
- Hooser S.B. (2007b). Iron. En: Gupta R.C. (ed), *Veterinary Toxicology* (2a ed.). Academic Press, Oxford, pp. 433–437.
- Horai S., Watanabe I., Takada H., Iwamizu Y., Hayashi T., Tanabe S., Kuno K. (2007). Trace element accumulations in 13 avian species collected from the Kanto area, Japan. *Sci. Total Environ.* 373, 512–525.
- IUCN (2017). The IUCN Red List of Threatened Species. Recuperado el 26/05/2019 de <http://www.iucnredlist.org/search>.
- Jenkins J.R. (1994). Avian metabolic chemistries. *Semin. Avian Exotic Pet Med.* 3, 25–32.
- Jerzak L., Sparks T.H., Kasprzak M., Bochenski M., Kamiński P., Wiśniewska E., Mroczkowski S., Tryjanowski P. (2010). Blood chemistry in white stork *Ciconia ciconia* chicks varies by sex and age. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 156, 144–147.
- Jiménez B., Gomara B., Baos R., Hiraldo F., Eljarrat E., Rivera J., González M.J. (2000). A study of the toxic equivalents derived from PCDDs, PCDFs and Dioxin-Like PCBs in two bird species (*Ciconia ciconia* and *Milvus migrans*) nesting in a protected area (Doñana National Park, Spain). *Organohalogen Compd.* 46, 542–545.
- Kamiński P., Kurhalyuk N., Szady-Grad M. (2007). Heavy metal-induced oxidative stress and changes in physiological process of free radicals in the blood of white stork (*Ciconia ciconia*) chicks in polluted areas. *Pol. J. Environ. Stud.* 16(4), 555–562.
- Kamiński P., Kurhalyuk N., Kasprzak M., Jerzak L., Tkachenko H., Szady-Grad M., Klawe J.J., Koim B. (2009). The impact of element–element interactions on antioxidant enzymatic activity in the blood of white stork (*Ciconia ciconia*) chicks. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 325–337.



- Kamiński P., Jerzak L., Sparks T.H., Johnston A., Bochenski M., Kasprzak M., Wiśniewska E., Mroczkowski S., Tryjanowski, P. (2014). Sex and other sources of variation in the haematological parameters of white stork *Ciconia ciconia* chicks. *J. Ornithol.* 155, 307–314.
- Kamiński P., Kurhalyuk N., Szady-Grad M., Tkachenko H., Kasprzak M., Jerzak L. (2008). Chemical elements in the blood of White stork *Ciconia ciconia* chicks in differential Poland regions. *Med. Biol. Sci.* 22/4, 31–37.
- Kendall R., Anderson T., Baker R.J., Bems C.M., Carr J.A., Hooper M., Martin C.F., McMurry S., Patino R., Smith, E.E., *et al.* (2001). Environmental Toxicology. En: Klaasen, C.D. (ed), Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (6a ed.) McGraw Hills Professional, pp. 1013–1046.
- Kerr M.G. (2002). Clinical Biochemistry. En: Kerr, M.G (ed), Veterinary Laboratory Medicine Clinical Biochemistry and Haematology. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, pp. 69–148.
- Kruszyk R., Ciach M. (2010). White storks, *Ciconia ciconia*, forage on rubbish dumps in Poland—a novel behaviour in population. *Eur. J. Wildl. Res.* 56, 83–87.
- Kulczykowska E., Kasprzak M., Kalamarz H., Kuriata M., Nietrzeba M., Jerzak L., Kamiński P. (2007). Melatonin and thyroxine response to pollution in white stork nestlings (*Ciconia ciconia*): Aspects of rhythmicity and age. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 146, 392–397.
- Kurhalyuk N., Kamiński P., Kasprzak M., Jerzak L. (2006). Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation processes in the blood of white stork (*Ciconia ciconia*) chicks from W Poland. En: Tryjanowski, P., Sparks, T. H., Jerzak, L.(eds.), The white stork in Poland: studies in biology, ecology and conservation. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznan, pp. 482-498.
- Kurhalyuk N., Kamiński P., Kasprzak, Jerzak L. (2006). Circadian periodicity of antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation processes in the blood of white stork *Ciconia ciconia* chicks: results of a pilot study. En: Tryjanowski P., Sparks T.H., Jerzak L. (eds), The white stork in Poland: studies in biology, ecology and conservation. Bogucki Wydawnictwo Naukowe, Poznan, 353-357.
- Lagadic L., Caquet T., Amiard-Triquet C., Ramade F. (1998). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier, TecDoc, Paris.
- Landinez M.P. (2010). Perfil bioquímico em aves: utilidade na prática. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Recuperado el 15/04/2019 de https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/bioquimico_aves_martha.pdf
- Lanzarot M.P., Barahona M.V., Andrés M.I.S., Fernández-García M., Rodríguez C. (2005). Hematologic, protein electrophoresis, biochemistry, and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*Ciconia nigra*). *J. Wildl. Dis.* 41, 379–386.
- Levengood J.M., Beasley V.R. (2007). Principles of ecotoxicology. En: Gupta, R.C. (ed), Veterinary Toxicology (2a ed.). Academic Press, Oxford, pp. 689–708.



- Liu J., Goyer R.A., Waalkes M.P. (2010). Toxic Effects of Metals. En: Klaassen C.D. Watkins J.B.III (eds), Casarett Doull's Essentials of Toxicology (2a ed.). McGraw Hills Companies), China, pp. 323-333.
- Lucia M., André J.-M., Gontier K., Diot N., Veiga J., Davail S. (2010). Trace element concentrations (mercury, cadmium, copper, zinc, lead, aluminium, nickel, arsenic, and selenium) in some aquatic birds of the southwest Atlantic coast of France. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 844–853.
- Lumeij J.T. (1994a). Avian Clinical Enzymology. *Semin. Avian Exot. Pet Med.* 3, 14–24.
- Lumeij J.T. (1994b). Hepatology. En: Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. (eds), *Avian Medicine: Principles and Application* (6a ed.). Wingers Publishing Inc, Lake Worth, Florida, pp. 522–537.
- Lumeij J.T. (2008). Avian Clinical Biochemistry. En: Kaneko, J.J., Harvey, J. W. Bruss, M.L. (eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6a ed.). Academic Press, Elsevier, pp. 839–872.
- Maceda-Veiga A., Figuerola J., Martínez-Silvestre A., Viscor G., Ferrari N., Pacheco M. (2015). Inside the Redbox: applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Sci. Total Environ.*, 514, 322-332.
- Marriott L.D., Foote K.D., Kimber A.C., Delves H.T., Morgan J.B. (2007). Zinc, copper, selenium and manganese blood levels in preterm infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 92, F494–F497.
- Martínez (1995). El uso de vertederos por la Cigüeña Blanca como nuevas fuentes de alimentación. En: Biber O., Enggis, P., Martí, C Salathe, T. (eds.). *Proceedings of the International Symposium of White Stork (Western population)*, 159-162, Basel.
- Martínez-Haro M., Green A.J., Mateo R. (2011). Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in waterbirds in the field. *Environ. Res.* 111, 530–538.
- Martínez-López E., Martínez J.E., Maria-Mojica P., Penalver J., Pulido M., Calvo J.F., García-Fernández A.J. (2004). Lead in feathers and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in three raptor species from an unpolluted Mediterranean forest (Southeastern Spain). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 270–275.
- Mateo R., Taggart M., Meharg A.A. (2003). Lead and arsenic in bones of birds of prey from Spain. *Environ. Pollut.* 126, 107–114.
- Meharg A.A., Pain D.J., Ellam R.M., Baos R., Olive V., Joyson A., Powell N., Green A.J., Hiraldo F. (2002). Isotopic identification of the sources of lead contamination for white storks (*Ciconia ciconia*) in a marshland ecosystem (Doñana, SW Spain). *Sci. Total Environ.* 300, 81–86.
- Melancon M.J. (2003). Bioindicators of contaminant exposure and effect in aquatic and terrestrial monitoring. En: Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A., Cairns, J. (eds.), *Handbook of Ecotoxicology* (2a ed.). Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 257–278.



- Molina B., Del Moral J.C. (2005). La cigüeña blanca en España. VI censo internacional (2004). SEO/BirdLife, Madrid.
- Montesinos A., Sainz A., Pablos M.V., Mazzucchelli F., Tesouro M.A. (1997). Hematological and plasma biochemical reference intervals in young white storks. *J. Wildl. Dis.* 33, 405–412.
- Mostaghni K., Badiei K., Nili H., Fazeli A. (2005). Haematological and biochemical parameters and the serum concentrations of phosphorus, lead, cadmium and chromium in flamingo (*Phoenicopterus ruber*) and black-headed gull (*Larus ridibundus*) in Iran. *Comp. Clin. Pathol.* 14, 146–148.
- Muñoz-Arnanz J. (2013). Análisis y evaluación de contaminantes orgánicos persistentes clásicos y emergentes en el Espacio Natural Doñana y su entorno. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid. Recuperado el 09/04/2019 de <http://espacio.uned.es/fez/eserv/tesisuned:Ciencias-Jmunoz/Documento.pdf>
- Muriel R., Schmidt D., Calabuig C.P., Patino-Martínez J., Ferrer M. (2013). Factors affecting plasma biochemistry parameters and physical condition of Osprey (*Pandion haliaetus*) nestlings. *J. Ornithol.* 154, 619–632.
- Nazifi S., Mosleh N., Nili H., Lari M.A., Poorghanbari G.H. (2012). Diurnal variations in serum biochemical parameters and their correlations with thyroid hormones in ostrich chicks (*Struthio camelus*). *Comp. Clin. Pathol.* 21, 1669–1675.
- Ohlendorf H.M. (2003). Ecotoxicology of Selenium. En: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton G.A. Cairns, J. (eds), *Handbook of Ecotoxicology*, (2a ed.). Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 465–500.
- Ohlendorf H.M., Heinz G.H. (2011). Selenium in birds. En: Beyer W.N., Meador J.P. (eds), *Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations* (2a ed.). CRC Press Taylor Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 669–696.
- Orłowski G., Kamiński P., Kasprzykowski Z., Zawada, Z., Koim-Puchowska B., Szady-Grad M., Klawe J.J. (2012). Essential and nonessential elements in nestling rooks *Corvus frugilegus* from eastern Poland with a special emphasis on their high cadmium contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 601–611.
- Osofsky A., Jowett P.L., Hosgood G., Tully T.N. (2001). Determination of normal blood concentrations of lead, zinc, copper, and iron in Hispaniolan Amazon parrots (*Amazona ventralis*). *J. Avian Med. Surg.* 15, 31–36.
- Osweiler G.D., Hovda L., Brutlag A., Lee J.A. (2011). *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion: Small Animal Toxicology*. John Wiley Sons.
- Pain D.J. (1989). Haematological parameters as predictors of blood lead and indicators of lead poisoning in the black duck (*Anas rubripes*). *Environ. Pollut.* 60, 67–81.
- Pastor N., López-Lázaro M., Tella J.L., Baos R., Hiraldo F., Cortés F. (2001). Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Doñana Ecological Disaster. *Mutagenesis* 16, 219–223.



- Pattee O.H., Pain D.J. (2003). Lead in the environment. En: Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton G.A. Cairns, J. (eds), *Handbook of Ecotoxicology* (2a ed.). Lewis Publishers, pp. 373–399.
- Peixoto N.C., Roza T., Flores É.M., Pereira M.E. (2003). Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-δ-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol. Lett.* 146, 17–25.
- Pérez-López M., Cid F., Oropesa A.L., Fidalgo L.E., Beceiro A.L., Soler F. (2006). Heavy metal and arsenic content in seabirds affected by the Prestige oil spill on the Galician coast (NW Spain). *Sci. Total Environ.* 359, 209–220.
- Pérez-López M., de Mendoza M.H., Beceiro A.L., Soler-Rodríguez F. (2008). Heavy metal (Cd, Pb, Zn) and metalloid (As) content in raptor species from Galicia (NW Spain). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 154–162.
- Pérez-López M., de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Galeano J., Míguez-Santiyán M.P., de Castro-Lorenzo A., Otero-Filgueiras M., Rivas-López O., Soler F. (2016). Concentrations of metals, metalloids, and chlorinated pollutants in blood and plasma of White stork (*Ciconia ciconia*) nestlings from Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 313–321.
- Plaza P. I., Lambertucci S. A. (2018). More massive but potentially less healthy: black vultures feeding in rubbish dumps differed in clinical and biochemical parameters with wild feeding birds. *PeerJ*, 6, e4645.
- Polo F.J., Celdrán J., Viscor G., Palomeque J. (1994). Blood chemistry of captive herons, egrets, spoonbill, ibis and gallinule. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 107, 343–347.
- Puerta M.L., Pulido R.M., Huecas V., Abelenda M. (1989). Hematology and blood chemistry of chicks of white and black storks (*Ciconia ciconia* and *Ciconia nigra*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.* 94, 201–204.
- Ramírez, M.P.G. (2011). El Búho real (*Bubo bubo*) como especie biomonitora de contaminantes ambientales persistentes en el sureste de España. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Recuperado el 18/01/2019 de <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/25653/1/TPGR.pdf>
- Reif J.S. (2011). Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Rep.* 126, 50–57.
- Richardson J.A. (2006). Implications of Toxic Substances in Clinical disorders. En: Harrison G.J., Lightfoot T.L. (eds.), *Clinical Avian Medicine*. Spix Pub, Palm Beach, Florida, pp. 711–719.
- Rosenthal K.L. (2019). Interpreting Avian Biochemistry Panels. Recuperado el 31/08/2019 de <https://www.vetfolio.com/learn/article/interpreting-avian-biochemistry-panels>.
- Rucker R.B., Fascetti A.J., Keen C.L. (2008). Trace Minerals. En: Kaneko, J.J., Harvey, J. W. Bruss, M.L. (eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6a ed.). Academic Press, Elsevier, pp. 663–693.



- Ruíz-Rodríguez J. (2013). Aproximación al análisis de bioquímica sanguínea y uroanálisis en animales silvestres y especies no convencionales. Memorias de la Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna silvestre, exótica y no convencional 9, 58–67.
- Sacristán I. (2012). Estudio de plomo, cadmio, mercurio y arsénico en hígado de aves silvestres de Extremadura: posibles efectos tóxicos y aplicaciones en la biomonitorización ambiental. Tesis de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.
- Samour J. (2006) Diagnostic value of hematology. En: Harrison J.G., Lightfoot T. (eds), Clinical avian medicine, vol 2. Florida Spix, Palm Beach, pp 587–610
- Scheuhammer A.M. (1987). The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: a review. *Environ. Pollut.* 46, 263–295.
- Scheuhammer A.M., Wilson L.K. (1990). Effects of lead and pesticides on δ -aminolevulinic acid dehydratase of ring doves (*Streptopelia risoria*). *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1379–1386.
- Seo-BirdLife (2020). Cigüeña blanca. Guía de las aves de España. Recuperado el 7/12/2020 de: <https://seo.org/ave/ciguena-blanca/>.
- Serrato F.B., Díaz A.R., Sarría F.A., Brotóns J.M., López S.R. (2010). Afección de suelos agrícolas por metales pesados en áreas limítrofes a explotaciones mineras del sureste de España. *Papeles Geogr.* 51-52, 45–54.
- Smith P.N., Cobb G.P., Godard-Codding C., Hoff D., McMurry S.T., Rainwater T.R., Reynolds K.D. (2007). Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environ. Pollut.* 150, 41–64.
- Sonne C., Bustnes J.O., Herzke D., Jaspers V.L., Covaci A., Eulaers I., Halley D.J., Moum T., Ballesteros M., Eens M. (2012). Blood plasma clinical–chemical parameters as biomarker endpoints for organohalogen contaminant exposure in Norwegian raptor nestlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80, 76–83.
- Spahn S.A., Sherry T.W. (1999). Cadmium and lead exposure associated with reduced growth rates, poorer fledging success of little blue heron chicks (*Egretta caerulea*) in south Louisiana wetlands. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 377–384.
- Stout J.D., Brinker D.F., Driscoll C.P., Davison S., Murphy L.A. (2010). Serum biochemistry values, plasma mineral levels, and whole blood heavy metal measurements in wild northern goshawks (*Accipiter gentilis*). *J. Zoo Wildl. Med.* 41, 649–655.
- Swiergosz R., Kowalska A. (2000). Cadmium accumulation and its effects in growing pheasants *Phasianus Colchicus* (L.). *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2742–2750.
- Thompson D.R. (1996). Mercury in birds and terrestrial mammals. En: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (eds), Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 341–356.
- Thompson L.J. (2007a). Lead. En: Gupta R.C. (ed), Veterinary Toxicology (2a ed.). Academic Press, Oxford, pp. 438–441.
- Thompson L.J. (2007b). Copper. En: Gupta R.C. (ed), Veterinary Toxicology (2a ed.). Academic Press, Oxford, pp. 427–429.



- Tsipoura N., Burger J., Feltes R., Yacabucci J., Mizrahi D., Jeitner C., Gochfeld M. (2008). Metal concentrations in three species of passerine birds breeding in the Hackensack Meadowlands of New Jersey. *Environ. Res.* 107, 218–228.
- Tsuji L.J.S., Karagatzides J.D. (2001). Chronic lead exposure, body condition, and testis mass in wild mallard ducks. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 489–495.
- USEPA United States Environmental Protection Agency (2014). Manganese (CASRN 7439-96-5). Recuperado el 19/05/2018 de <http://www.epa.gov/iris/subst/0373.htm>.
- Van den Bossche W., Berthold P., Kaatz M., Nowak E., Querner U. (2002). Eastern European White Stork populations: migration studies and elaboration of conservation measures. German Agency Natural Conservation, Bonn.
- Van Eeden P.H., Schoonbee H.J. (1996). Metal concentrations in liver, kidney, bone and blood of three species of birds from a metal-polluted wetland. *SA Waterbulletin* 22, 351–358.
- Wayland M., Scheuhammer A.M. (2011). Cadmium in birds. En: Beyer, W.N., Meador, J.P. (eds), *Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations*, (2a ed.). CRC Press Taylor Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 645–669.
- Wayland M., Alisauskas R.T., Kellett D., Traylor J., Swoboda C., Neugebauer E., Mehl K. (2007). Year-to-year correlations in blood metal levels among individuals of two species of North American sea ducks. *Environ. Pollut.* 150, 329–337.
- Wren C.D., Harris S., Harttrup N. (1995). Ecotoxicology of mercury and cadmium. En: Hoffman D.J., Cairns Jr. J., Burton Jr. G.A., Rattner B.A. (eds.) *Handbook of Ecotoxicology*, Boca Raton, pp. 392–423.

OBJETIVOS

El **primer objetivo general** de esta tesis doctoral es comprobar la utilidad de la cigüeña blanca como especie bioindicadora de contaminación por elementos metálicos. Para ello, se tomaron muestras de ejemplares de distinta edad, sexo y procedencia: ingresados en el Centro de Recuperación de Fauna y Educación Ambiental “Los Hornos” de Sierra de Fuentes (Cáceres), y en tres colonias salvajes situadas en distintos escenarios de posible contaminación ambiental en la provincia de Cáceres. Estos escenarios representan la influencia de cercanía a vertederos urbanos, a zona de agricultura intensiva, a carretera nacional y a otra de pastizal localizada en una Zona de Especial Protección para Aves (ZEPA), así clasificada por su extraordinaria riqueza en aves de alta importancia ecológica y, que constituye un importante destino ornitológico.

Se propone utilizar en los estudios de la presente tesis una muestra no destructiva (sangre) porque permite repetir muestreos, si es necesario, sin provocar daño al animal y manteniendo la conservación de la especie. Por tanto, la utilización de la sangre de cigüeña blanca como muestra no destructiva, con el propósito de comprobar su aplicabilidad en estudios de contaminación metálica, tanto en Salud Pública y Animal como en Ecotoxicología, es el **segundo objetivo general**.

Consecuente con estos objetivos generales, los **objetivos específicos** que se persiguen, y que corresponden a cada uno de los capítulos desarrollados, son los siguientes:

1. Evaluar si existen diferencias en la concentración sanguínea de un total de 12 elementos químicos (metales y metaloides) entre polluelos y aves adultas de cigüeña blanca.
2. Determinar los valores del biomarcador de respuesta al plomo Δ -ALAD, en la cigüeña blanca, así como el hematocrito y la hemoglobina, y relacionarlos con las concentraciones sanguíneas de plomo y establecer un valor umbral de Pb en sangre que inhiba significativamente la Δ -ALAD.
3. Estudiar la tendencia temporal de los niveles de metales pesados (Pb, Cd, Hg) y arsénico de 1998 a 2009, en un periodo de 10 años (antes y después de la introducción de medidas restrictivas y reglamentaciones a su producción, uso y aplicaciones), utilizando muestras de sangre de polluelos de cigüeña blanca.
4. Obtener valores de referencia para diversos parámetros bioquímicos en plasma de cigüeña blanca, estudiando la influencia de la edad y relacionarlos con los niveles de metales en sangre, en tres hábitats con diferentes niveles de contaminación.

CAPÍTULO I

Concentración de 12 metales y metaloides en sangre de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*): valores basales e influencia de la edad y el sexo.

PUBLICACIÓN: Maia A.R., Soler-Rodríguez F., Pérez-López M. (2017). Concentration of 12 Metals and Metalloids in the Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*): Basal Values and Influence of Age and Gender. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 73(4), 522–532. doi:10.1007/s00244-017-0431-8



RESUMEN

La cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) se utiliza cada vez más en programas de biomonitorización de contaminantes ambientales debido a su creciente población en Europa; sin embargo, apenas existen estudios acerca de elementos inorgánicos. Se recogió y analizó la sangre de 70 cigüeñas blancas mediante espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) con el fin de determinar la presencia de los siguientes elementos: plomo (Pb), mercurio (Hg), arsénico (As), níquel (Ni), hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu), selenio (Se), manganeso (Mn), cromo (Cr), cobalto (Co) y cadmio (Cd). Nuestros objetivos principales consistían en determinar las concentraciones medias en sangre de estos elementos y estudiar su relación con la edad y el sexo.

Las concentraciones medias más elevadas fueron las de Fe, seguidas de Zn, y las más bajas las de Co y Cd. Los niveles de metales resultaron similares a los indicados en la literatura existente para la misma especie ubicada en distintos lugares. No se hallaron diferencias de relevancia estadística entre machos y hembras. En cuanto a la edad, se observaron diferencias estadísticamente significativas para Ni, Cu, Se, Hg y Pb entre los animales jóvenes y los adultos (excepto en el caso de Pb, los valores de los especímenes adultos eran mayores que los de los pollos). Se observaron correlaciones entre muchas concentraciones de elementos; de esas correlaciones, las más intensas se dieron entre las parejas Hg y Se, Hg y As, y Fe y Zn, sobre todo en adultos. El presente estudio proporciona los datos de partida para un programa de vigilancia basado en la sangre de la cigüeña blanca como muestreo no destructivo.

Palabras clave: Cigüeña blanca; edad; metales; sangre; biomonitorización

ABSTRACT

The white stork (*Ciconia ciconia*) is being increasingly used in biomonitoring programmes of environmental contaminants due to its growing population in Europe; however, studies on inorganic elements are scarce. The blood of 70 white storks was collected and analysed by inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS) to determine the presence of the following elements: lead (Pb), mercury (Hg), arsenic (As), nickel (Ni), iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), selenium (Se), manganese (Mn), chromium (Cr), cobalt (Co), and cadmium (Cd). Our main goals were to determine the mean concentrations of these elements in the blood and to study its association with age and gender. Mean concentrations were highest for Fe, followed by Zn, and lowest for Co and Cd. The metal levels were similar to the values referred in the literature for the same species from different locations. No statistically significant differences were found between males and females. Regarding age, statistically significant differences were observed for Ni, Cu, Se, Hg, and Pb between young and adult animals (except for Pb, values in adults were higher than in fledglings). Many element concentrations were correlated, with the strongest correlations between the pairs Hg–Se, Hg–As, and Fe–Zn, mainly in adults. This study provides the baseline data for a monitoring program based on white stork blood as a nondestructive sample.

Keywords: White stork, age; metals; blood; biomonitoring



1.1. INTRODUCCIÓN

Las aves han desempeñado un papel destacado en la vigilancia de los distintos tipos de contaminantes que se liberan en el medioambiente (Furness, 1993). A pesar de que muchos estudios de biomonitorización que se sirven de aves se han llevado a cabo sobre tejidos internos, cada vez son más los que hacen uso de métodos no destructivos, como medir las concentraciones en huevos aún sin eclosionar, en heces, en plumas y/o en sangre (Blanco *et al.*, 2003; Berglund *et al.* 2011; Burger y Gochfeld, 2009; De la Casa-Resino *et al.* 2015a, b). Para determinar una exposición reciente a contaminantes inorgánicos, el tejido más idóneo en una biomonitorización no destructiva es la sangre, ya que se obtiene de manera rápida y sencilla con un riesgo mínimo para el animal y puede volver a conseguirse en repetidas ocasiones del mismo sujeto si hiciera falta y sin sacrificio (Fossi y Leonzio, 1993). No obstante, para evaluar de forma adecuada la salud de un ecosistema por medio de la biomonitorización se debe realizar una selección de especies representativas, ya que algunas tienen hábitos biológicos que incrementan sus posibilidades de exposición a contaminantes y, por tanto, proporcionan información relevante (Carneiro *et al.*, 2014). Se ha considerado que la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) es un buen indicador de la calidad del medio natural (Tkachenko y Kurhaluk, 2012), y se ha utilizado la sangre de pollos de esta especie como bioindicador de contaminación ambiental por metales (Baos *et al.*, 2006a, b; Benito *et al.*, 2009; Cabo *et al.*, 2012; De la Casa-Resino *et al.*, 2014, 2015b; Kamiński *et al.*, 2006, 2008; Pérez-López *et al.*, 2016). También se ha utilizado sangre de cigüeña blanca en algunos estudios de biomonitorización de contaminantes orgánicos (Blázquez *et al.*, 2006; De la Casa *et al.*, 2015a, b; Pérez-López *et al.*, 2016). Los metales y metaloides son componentes naturales del medioambiente, y muchos resultan esenciales para actividades metabólicas e indispensables para la vida, como el cobalto (Co), el cobre (Cu), el hierro (Fe), el manganeso (Mn) y el selenio (Se) (Benito *et al.*, 2009); sin embargo, en altas dosis pueden resultar tóxicos (Benito *et al.*, 2009; Carneiro *et al.*, 2014; Lucia *et al.*, 2010). Además, los niveles de fondo del medioambiente influyen en la variabilidad de los niveles de estos elementos encontrados en las aves (Blanco *et al.*, 2003), y se reflejarán en las cantidades acumuladas. Otros elementos, tales como el plomo (Pb), el mercurio (Hg), el níquel (Ni), el cadmio (Cd) y el arsénico (As) no suelen ser necesarios para la actividad metabólica, resultan extremadamente tóxicos para la fauna e, incluso en bajas dosis, pueden producir efectos perjudiciales en animales (Carneiro *et al.*, 2014; Florea y Busselberg, 2006; Merian, 1991). De hecho, la contaminación provocada por metales y metaloides representa una grave amenaza para los ecosistemas y es responsable de numerosas patologías existentes en el mundo animal (Lucia *et al.*, 2010). Estos elementos se suelen encontrar en el medioambiente a causa de acontecimientos naturales y/o de actividades humanas, como la industria o la agricultura (Lucia *et al.*, 2010), y su concentración podría verse incrementada a través de redes tróficas (Hernández *et al.*, 1999; Koivula y Eeva, 2010).

Es bien sabido que incluso especies de aves estrechamente relacionadas pueden reflejar distintos niveles de acumulación y excreción de metales (Beyer *et al.*, 1988; Berglund *et al.* 2011; Burger y Gochfeld, 2009; Eeva *et al.* 2009; Hofer *et al.*, 2010). Este hecho



podría estar relacionado con los distintos niveles tróficos, las dietas o los requisitos fisiológicos y ecológicos de los oligoelementos específicos de cada especie (Berglund *et al.*, 2011). De hecho, hay numerosos factores que influyen en los niveles de oligoelementos y en sus efectos sobre el organismo y que tienen que ver con el hábitat, con la fisiología y con la historia vital del animal (Peakall y Burger, 2003). Además, en ocasiones también pueden darse interacciones entre elementos, incluidos elementos esenciales que pueden desempeñar un papel fundamental en la desintoxicación de elementos tóxicos (como, por ejemplo, el Se como elemento importante en la detoxificación del Hg, respectivamente) (Yang *et al.*, 2008).

A la hora de interpretar las concentraciones de metales en sangre, también debería tenerse en cuenta la edad de las aves (García-Fernández *et al.*, 1996; Burger y Gochfeld, 1997a). El muestreo de pollos que aún no han abandonado el nido tiene la ventaja de suministrar datos de un período de tiempo y de un territorio limitados, pues todo el alimento que reciben proviene en su totalidad de recursos locales (De la Casa-Resino *et al.*, 2014). Por otro lado, como se ha dicho antes, los adultos pueden acumular metales durante un período mayor de tiempo, así como durante la migración (Furness, 1993; Berglund *et al.*, 2011). La mayoría de los estudios acerca de la presencia de metales en la sangre de las cigüeñas blancas se han centrado en los pollos (Álvarez *et al.*, 2013; Baos *et al.*, 2006a, b; Benito *et al.*, 2009; Cabo *et al.*, 2012; De la Casa-Resino *et al.*, 2014, 2015b; Meharg *et al.*, 2002; Pérez-López *et al.*, 2016), y solo uno de ellos presentaba un incremento de la concentración de Cd, Pb y Co en la sangre de los pollos de cigüeña blanca durante su desarrollo (Tkachenko y Kurhaluk, 2012). Prácticamente no existe información relativa a la concentración de metales en cigüeñas blancas adultas, y la que hay se limita a los tejidos internos, como el riñón, el hígado o la musculatura (Gómez *et al.*, 2004). Por tanto, hacen falta datos acerca de las diferencias potenciales en los niveles de metales en las cigüeñas blancas según su edad.

Se ha indicado que el sexo es un factor relevante en la acumulación de Cd en el hígado de varias especies de aves, entre las que se encuentra la cigüeña blanca, que muestran mayores concentraciones en machos que en hembras (Gómez *et al.*, 2004). Las hembras podrían transferir metales a los huevos (por ejemplo, Hg, Pb y Ni) (Blanco *et al.*, 2003; Mansouri y Hoshyari, 2012), pero, por lo general, sería en una cantidad inferior a la que se excreta durante la muda (Furness, 1993; Honda *et al.*, 1986). A pesar de que varios estudios han mostrado diferencias relevantes en los niveles de metales entre las aves macho y las hembras, dichas diferencias pueden considerarse insignificantes en comparación con los elevados niveles de variación individual (Furness, 1993). Peakall y Burger (2003) también refirieron diferencias relacionadas con el sexo en la susceptibilidad de las aves a los metales, debido a que la diferencia de tamaño entre machos y hembras condiciona el tipo de presa de la que se alimentan y sus dimensiones (y, por consiguiente, la cantidad de contaminantes que ingieren). La cigüeña blanca es una especie de ave monomórfica, y su tamaño y aspecto resulta similar en ambos sexos (Kamiński *et al.*, 2015). Por tanto, no se esperan diferencias en su alimentación relacionadas con tipos y tamaños de presa diferentes, ni importantes diferencias en la concentración de elementos químicos en sangre. No obstante, que sepamos, nunca antes



se ha estudiado la influencia del sexo en los niveles de metales en la sangre de la cigüeña blanca.

Se recopilaron muestras de sangre de pollos de cigüeñas blancas y de especímenes adultos en Extremadura, en la zona occidental de España, y se analizaron 12 elementos (Fe, zinc [Zn], Cu, Se, Pb, Hg, Mn, As, Ni, cromo [Cr], Co y Cd). El estudio se diseñó con el objeto de evaluar el grado de exposición de la cigüeña blanca a estos elementos, así como de determinar si su edad o su sexo afectaban a los niveles de los mismos en su sangre, tal y como ocurre con otras especies de aves. De los 12 elementos, algunos se escogieron por tratarse de elementos no esenciales considerados extremadamente tóxicos (As, Cd, Pb y Hg), y el resto por ser oligoelementos esenciales cuyo metabolismo puede resultar alterado por los no esenciales.

I.2. MATERIALES Y MÉTODOS

I.2.1. Selección de animales y toma de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron de un total de 70 cigüeñas blancas que habitaban en el Centro de Recuperación de Fauna «Los Hornos», en Extremadura (España), a lo largo de 2006 (11 pollos), 2007 (26 pollos y 19 adultos) y 2008 (14 adultos). Las aves se clasificaron en dos grupos de aves: adultas, con más de 2 años de edad, pico rojo intenso y patas rojas ($n = 33$), y juveniles, que comprendían a pollos volantones de entre 6 y 9 semanas ($n = 37$). Los pollos se encontraban ingresados en el Centro de Recuperación por haber sufrido una caída mientras practicaban el vuelo, sin haber sufrido lesiones importantes (caída del nido). Los especímenes adultos de nuestro estudio ingresaron tras electrocutarse con cables de alta tensión o tras sufrir heridas en las alas que les impidieran volar; en ambos casos, no habían padecido una pérdida importante de sangre ni heridas que pusieran en riesgo su vida. Se recogieron las muestras de sangre cuando los animales ya se habían recuperado de sus procesos inflamatorios y su estado de salud hacía posible la extracción de sangre (5-10 días). El personal veterinario del Centro de Recuperación realizó una evaluación física y clínica de todas y cada una de las aves. Se les mantenía en el exterior, en una jaula de vuelo (20 m x 20 m x 5 m) con agua *ad libitum*. Durante todo el período de recuperación, su dieta se basó en carne de pollo troceada y en crías de gallina muertas de un día de vida (*Gallus gallus domesticus*). El gobierno local (la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Extremadura) dio su autorización para la toma de muestras de sangre.

Se tuvo mucho cuidado al efectuar la manipulación de las aves, a las que se contuvo con delicadeza entre las manos durante la extracción de sangre para generarles un estrés mínimo. Las muestras de sangre se tomaron por la mañana para evitar errores provocados por variaciones circadianas, durante la primavera. Las muestras de sangre (3-5 ml) se obtuvieron de la vena braquial utilizando una aguja de 0,8 x 25 mm y una jeringa heparinizada (heparina de litio). Como marcan las directrices generales de la práctica clínica, la sangre extraída de cada ave no representaba más de un 1 % de su peso corporal (Gaunt y Oring, 1997). Para realizar el análisis elemental, la muestra se transfirió a tubos



Eppendorf® de 1,5 ml que se habían lavado previamente con HNO₃ al 2 %. Además, se preservó una gota de sangre en alcohol dentro de un tubo Eppendorf® para identificar con precisión el sexo del animal. Cada muestra se etiquetó, se refrigeró y se transportó de forma individual al laboratorio en el que todas se conservaron a -80 °C hasta que se efectuó la determinación de los elementos mediante espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

1.2.2. Determinación de elementos en sangre

Se puede consultar una descripción detallada de la metodología y de las condiciones analíticas de este estudio en De la Casa-Resino *et al.* (2014). En resumen, se añadieron 200 µL de sangre a 50 µL de isopropanol y a 25 µL de la solución de estándar interno (compuesta por itrio, renio, rodio y telurio a 10 mg/L, adquirido de PerkinElmer Inc.). A esta mezcla se añadió también una solución acuosa que contenía NH₄OH (0,7 mM), Tritón X-100 (0,07 % v/v), y EDTA (0,01 mM) hasta alcanzar un volumen total de 5 mL; se mezcló todo mediante un agitador vórtex. El análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Elemental y Molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAIUEX, certificado mediante norma ISO 9001:2008) de la Universidad de Extremadura (Cáceres, España), usando un ICP-MS modelo NexION 300D equipado con un automuestreador S10 (PerkinElmer, Inc.). El método escogido fue ICP-MS, ya que proporciona unos límites de detección adecuadamente bajos y permite la identificación simultánea de varios elementos. El límite de detección (LD) de los elementos en sangre se estableció en 1,40 µg/L para Cr, 0,92 µg/L para Ni, 41,18 µg/L para Fe, 3,46 µg/L para Cu, 059 µg/L para Mn, 0,42 µg/L para Co, 0,25 µg/L para Cd, 0,21 µg/L para Pb, 3,01 µg/L para Hg, 1,55 µg/L para Se, 13,45 µg/L para Zn, y 0,50 µg/L para As. Todos los días se preparaban soluciones de calibración utilizando el “Multi-element Calibration Standard 3” de 10 mg/L de PerkinElmer, Inc. (Shelton, CT) que se analizaron del mismo modo que las muestras. Se utilizó una muestra de referencia certificada de sangre entera (Seronorm® Trace Elements Whole Blood) para una mayor precisión de los análisis. Los valores obtenidos para cada elemento resultaban coherentes con los valores de referencia certificados. Las recuperaciones obtenidas variaron del 92 % (Hg) al 107 % (Se), y los coeficientes de variación de las muestras duplicadas (n = 5) fueron inferiores al 6,5 %. Las jeringas y tubos utilizados para la toma de muestras sanguíneas, así como todo el material utilizado en este análisis, se lavaron previamente con ácido nítrico al 10 %, y se incluyeron blancos (incluida la heparina de litio) en cada tanda de análisis.

1.2.3. Identificación del sexo

Debido a que la cigüeña blanca es una especie monomórfica, se utilizó una técnica de PCR basada en la secuencia CDH-W del cromosoma W para determinar el sexo de los animales, tal y como describen Griffiths *et al.* (1996). Las hembras cuentan con cromosomas heterogaméticos (ZW), mientras que los machos tienen dos cromosomas idénticos (ZZ). La Unidad de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura (Cáceres, España) aplicó esta metodología y determinó con certeza el sexo de 23 pollos de cigüeña blanca y de 19 especímenes adultos. Por lo tanto, la influencia del sexo tan solo se estudió en 42 animales.



1.2.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se presentaron en base a medias \pm desviación estándar (DE), percentiles 25 y 75, y valores medios, mínimos y máximos para la totalidad de las muestras. También se agruparon los resultados por edad (pollos o adultos).

Los datos se analizaron mediante el software estadístico Prism 6, versión para Windows (*GraphPad software, Inc., CA*) y la hoja de cálculo de LibreOffice. Se comprobó la normalidad de los datos (prueba de Kolmogorov–Smirnov, D’Agostino–Pearson y Shapiro–Wilk) y su homocedasticidad (prueba de Levene), pero la distribución de los datos difería significativamente de la normal. Tras la transformación logarítmica, no todas las variables mostraban una distribución normal, y no se cumplían las hipótesis de las pruebas paramétricas, por lo que en todos los análisis se utilizaron pruebas no paramétricas. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes al comparar dos grupos (pollos de 2006 frente a pollos de 2007; adultos de 2006 frente a adultos de 2007; pollos frente a adultos; hembras frente a machos). Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (seguida por la prueba de *Dunn post-hoc*) para comparar cuatro grupos con muestras inferiores a 30 (pollos machos; pollos hembras; hembras adultas; machos adultos) a la hora de estudiar la influencia de ambos factores (edad y sexo) para cada elemento. Para evaluar la correlación entre las distintas concentraciones de elementos en sangre se utilizó la prueba de correlación de Spearman. Se consideró que los datos tenían significación estadística con $p < 0,05$.

Se asignó un valor de la mitad del límite de detección a cada muestra de sangre por debajo del LD y se incluyó en el conjunto de datos para su tratamiento estadístico; esta técnica minimiza las probabilidades de errores nominales tipo I (Clarke, 1998).

1.3. RESULTADOS

La mayoría de las muestras analizadas presentaban valores por encima del LD para los elementos evaluados, excepto en el caso de Cr, Ni, Cd, As, Co y Hg (con 57 %, 35 %, 30 %, 11 %, 1.4 % y 1.4 % de las muestras por debajo del LD, respectivamente). Co y Cd fueron los elementos que registraron una menor concentración en sangre, mientras que Fe, Zn y Cu presentaron las concentraciones más altas (**Tabla 14**).

No se observaron diferencias estadísticas al comparar los datos de muestreo obtenidos de años diferentes para cada grupo de edad ($p > 0.05$ en la prueba de Mann-Whitney para los polluelos de 2006 frente a los polluelos de 2007, y a los adultos de 2006 frente a los adultos de 2007 en todas las variables analizadas). Es decir, no se tuvieron en cuenta los años en los que se tomaron las muestras a la hora de agrupar los especímenes por edad, y solo se consideraron dos grupos: pollos y adultos.

1.3.1. La influencia de la edad y del sexo

Se observó una influencia estadística de la edad en la concentración de cinco elementos: Ni, Cu, Se, Hg y Pb (**Tabla 15**). Los valores de Ni, Cu, Se y Hg en adultos eran mayores que en pollos. En el caso de Pb se observó lo contrario. No se detectaron diferencias de relevancia estadística en las concentraciones al considerar únicamente el sexo.



Sin embargo, al analizar la edad y el sexo de forma simultánea (**Tabla 16**), las diferencias relativas a la edad observadas previamente para Se y Pb se asociaron directamente a los machos en el caso del Se (**Figura 4**). Cabe destacar que durante la evaluación de edad y sexo de manera simultánea se halló una diferencia con relevancia estadística de Cr entre los cuatro grupos ($p < 0,05$), debido sobre todo a la diferencia estadísticamente significativa entre los pollos hembras (todos los animales de este grupo presentaban valores $< LD$) y los machos adultos (la media más alta).

Tabla 14. Estadísticos principales de todas las variables estudiadas (media \pm DE, SEM, valor máximo y mínimo de las concentraciones [entre paréntesis: porcentaje de las muestras con valores $< LD$], mediana y percentiles 25 % y 75 % obtenidos de la sangre de cigüeña blanca ($n = 70$).

	Media \pm DE	SEM	Mínimo (% $<LD$)	Percentil 25%	Mediana	Percentil 75%	Máx.
Fe (mg/L)	412,70 \pm 74,45	8,90	237,8	345,5	420,0	467,7	598,5
Cr (μg/L)	1,66 \pm 1,54	0,18	$< LD$ (57 %)	0,70	0,70	2,12	7,35
Cu (μg/L)	494,4 \pm 137,8	16,47	280,3	411,2	450,8	550,0	934,7
Mn (μg/L)	46,50 \pm 19,63	2,35	10,20	34,03	44,30	55,80	115,6
Ni (μg/L)	2,13 \pm 2,56	0,31	$< LD$ (35 %)	0,46	1,23	2,75	12,60
Zn (μg/L)	2314 \pm 245,9	29,39	1605	2137	2328	2486	2889
Se (μg/L)	363,6 \pm 163,6	19,55	122,9	251,4	331,8	431,5	988,4
As (μg/L)	20,96 \pm 38,94	4,65	$< LD$ (11 %)	1,62	6,11	24,63	259,8
Co (μg/L)	1,26 \pm 0,60	0,07	$< LD$ (1,4 %)	0,86	1,21	1,44	3,12
Cd (μg/L)	1,05 \pm 2,41	0,29	$< LD$ (30 %)	0,13	0,53	0,88	14,40
Hg (μg/L)	98,53 \pm 105,5	12,61	$< LD$ (1,4 %)	17,90	59,65	142,8	457,4
Pb (μg/L)	102,7 \pm 90,90	10,86	8,62	50,98	79,40	112,0	497,0

DE: desviación estándar.

SEM: error estándar de la media.

LD: límite de detección

Máx.: valor máximo.



Tabla 15. Estadísticos principales de todas las variables estudiadas (media \pm DE, mínimo, mediana, máximo) obtenidos a partir de la sangre de cigüeña blanca, según su edad (pollos n = 37; adultos n = 33)

	Pollos					Adultos				
	Media \pm DE	Mín.	Mediana	Máx.		Media \pm DE	Mín.	Mediana	Máx.	P ^(a)
Fe (mg/L)	403,4 \pm 59,61	288,20	410,7	521,2		423,2 \pm 87,97	237,8	421,8	598,5	Ns
Cr (μg/L)	1,23 \pm 0,85	<LD	0,70	3,75		2,13 \pm 1,97	<LD	0,70	7,35	Ns
Cu (μg/L)	437,4 \pm 107,8	280,30	422,9	873,8		558,4 \pm 141,0	364,6	528,8	934,7	***
Mn (μg/L)	49,71 \pm 16,16	29,70	45,70	115,6		42,89 \pm 22,63	10,20	38,20	89,00	Ns
Ni (μg/L)	1,61 \pm 2,53	<LD	0,46	12,60		2,72 \pm 2,50	<LD	2,15	10,70	***
Zn (μg/L)	2290 \pm 242,7	1605	2323	2889		2340 \pm 250,7	1817	2329	2808	Ns
Se (μg/L)	276,7 \pm 95,03	122,9	262,6	551,9		461,0 \pm 70,40	292,0	414,3	988,4	***
As (μg/L)	15,52 \pm 26,82	<LD	5,02	135,6		27,07 \pm 48,86	<LD	11,00	259,8	Ns
Co (μg/L)	1,35 \pm 0,63	0,62	1,22	3,02		1,16 \pm 0,54	<LD	1,19	3,12	Ns
Cd (μg/L)	1,20 \pm 3,14	<LD	0,42	14,40		0,89 \pm 1,16	<LD	0,59	6,76	Ns
Hg (μg/L)	49,81 \pm 52,17	<LD	30,60	232,5		153,2 \pm 123	5,97	116,2	457,4	***
Pb (μg/L)	130,6 \pm 108,5	8,62	90,10	497,0		71,29 \pm 51,39	9,40	62,00	244,6	*

DE: desviación estándar; Max.: valor máximo; Min.: valor mínimo, (a) prueba U de Mann-Whitney a dos colas.

Ns: no significativo; *p < 0,05; ***p < 0,00



Tabla 16. -Estadísticos principales de las variables en estudio para los grupos: pollos machos, pollos hembras, adultos machos y adultos hembras.

	Pollos machos (n=15)			Pollos hembras (n=8)			Adultos machos (n=11)			Adultos hembras (n=8)		
	Media ± DE	Mín.	Máx.	Media ± DE	Mín.	Máx.	Media ± DE	Mín.	Máx.	Media ± DE	Mín.	Máx.
Fe (mg/L)	396,8 ± 61,35	305,2	489,9	406,1 ± 34,13	363	459,3	430 ± 109,40	237,80	598,50	432,50 ± 56,91	345,60	512,10
Cr (µg/L)	1,44 ± 1,03	<LOD	3,75	(1)	<LD	<LD	3,17 ± 2,37	<LD	7,35	1,68 ± 1,41	<LD	4,32
Cu (µg/L)	424,4 ± 102,3	280,3	665,3	422,40 ± 90,67	306,9	557,1	529,40 ± 110,9	416,10	749	557,60 ± 149,30	364,6	778,3
Mn (µg/L)	49,13 ± 13,66	29,70	80,60	45,99 ± 8,68	35,10	58,80	43,20 ± 24,15	10,0	81,40	46,13 ± 22,49	20,80	86,10
Ni (µg/L)	2,01 ± 2,52	0,46	9,99	2,34 ± 4,17	0,46	12,60	3,77 ± 2,76	1,16	9,61	1,80 ± 1,13	0,46	3,04
Zn (µg/L)	2266 ± 191,5	1993	2601	2352 ± 204	1971	2597	2269 ± 312,20	1817	2808	2348 ± 160,1	2136	2652
Se (µg/L)	283,8 ± 107,4	122,9	551,9	297,7 ± 89,41	185,8	412,10	418,30 ± 114,7	292	684,8	395,5 ± 71,14	297,8	499,4
As (µg/L)	9,90 ± 12,80	0,95	41,20	6,39 ± 7,82	1,17	25,20	41,67 ± 78,99	<LD	259,80	18,99 ± 29,50	<LD	76,60
Co (µg/L)	1,35 ± 0,59	0,72	2,89	1,16 ± 0,25	0,85	1,52	1,27 ± 0,37	0,67	2,09	0,99 ± 0,52	<LD	1,59
Cd (µg/L)	1,41 ± 3,43	<LD	13,70	2,20 ± 4,94	<LD	14,4	1,52 ± 1,87	<LD	6,76	0,56 ± 0,25	<LD	0,90
Hg (µg/L)	35,55 ± 42,47	<LD	155,90	48,01 ± 42,40	11,20	121,5	146,30±141,60	6,27	457,40	88,82 ± 100,5	5,97	295,3
Pb (µg/L)	126,80 ± 120,1	8,62	383,00	119,20 ± 47,35	80	227,3	54,43 ± 46,03	9,40	166,50	66,23 ± 49,15	13,00	163,0

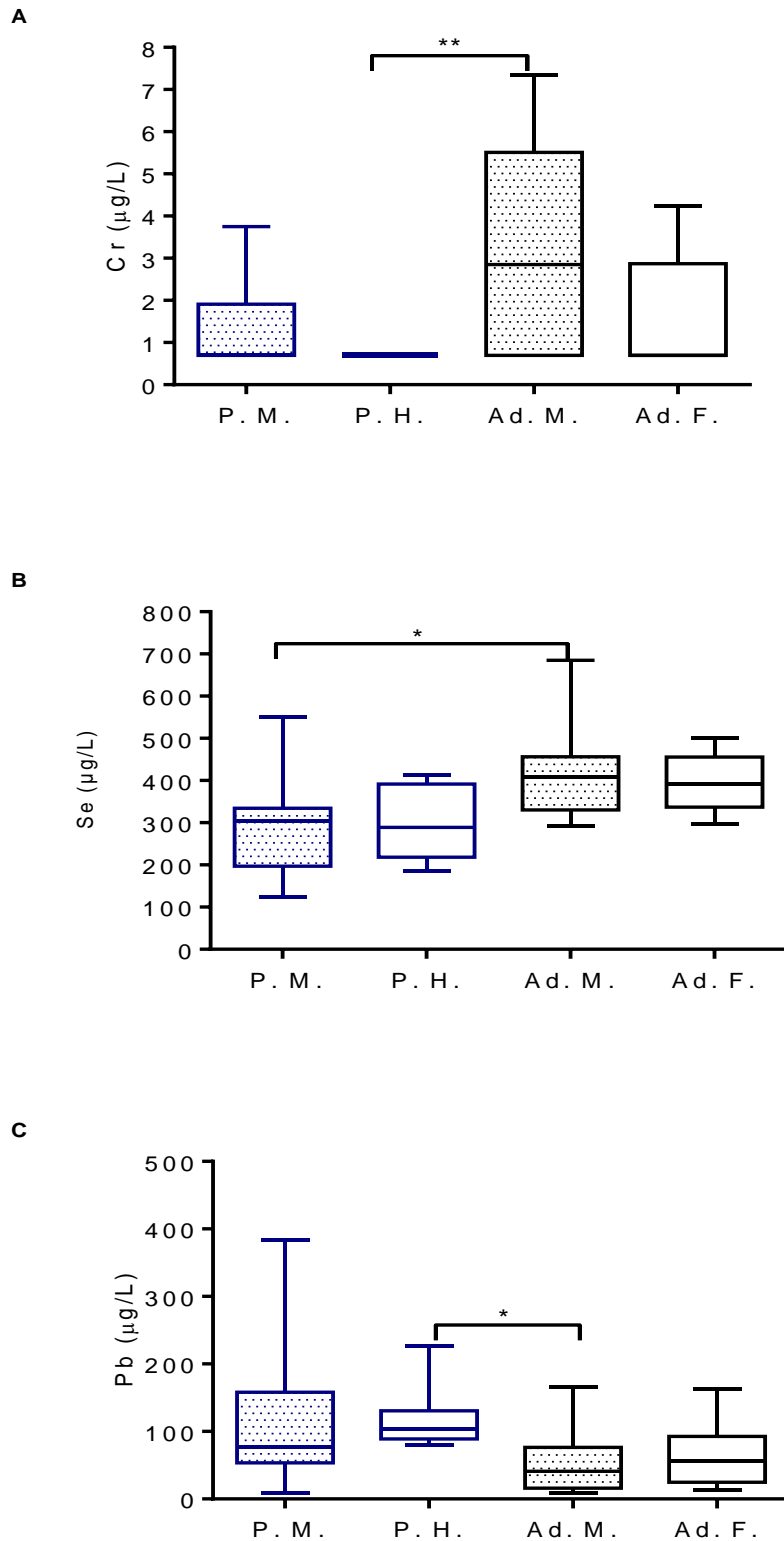


Figura 4. Representación de los metales en los casos donde se hallaron diferencias con relevancia estadística tras las pruebas de Kruskal-Wallis y de Dunn: Cr (A), Se (B) y Pb (C). Grupos: M (machos); H (hembras), P (pollos); Ad (adultos). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

**I.3.2. Correlaciones**

Respecto al análisis de correlación, se detectaron varias correlaciones inter-elementos significativas (**Tabla 17**). Al evaluar todos los datos de forma conjunta, se obtuvo un total de 20 correlaciones de Spearman relevantes, la mayoría de las cuales fueron positivas, mientras que solo dos (Mn-Zn y Ni-Pb) resultaron negativas. Los elementos con un mayor número de correlaciones significativas fueron As, Mn y Cu (6, 6 y 5, respectivamente), no obstante, las correlaciones más importantes se hallaron en los pares Hg-Se, Hg-As y Fe-Zn (**Figura 5**).

Tabla 17. Valores «p» para la correlación de Spearman entre elementos hallados en sangre de cigüeña blanca, sin tener en cuenta edad y sexo.

	Cr	Cu	Mn	Ni	Zn	Se	As	Co	Cd	Hg	Pb
Fe	0,7561	0,2494	0,0833	0,9404	0,0000	0,1795	0,3285	0,5732	0,8504	0,1998	0,9899
Cr		0,0003	0,0101	0,0906	0,0587	0,0727	0,1299	0,8507	0,1764	0,8296	0,1038
Cu			0,0334	0,2177	0,6432	0,0000	0,0276	0,6163	0,4208	0,0132	0,5428
Mn				0,2374	-0,0396	0,7077	0,0119	0,0483	0,4557	0,7824	0,0009
Ni					0,8230	0,0652	0,0506	0,5947	0,0003	0,5893	-0,0149
Zn						0,3666	0,5552	0,7388	0,1804	0,1169	0,3585
Se							0,0000	0,0064	0,1234	0,0000	0,6083
As								0,0009	0,2990	0,0000	0,0046
Co									0,9601	0,0472	0,0721
Cd										0,2466	0,9275
Hg											0,3158

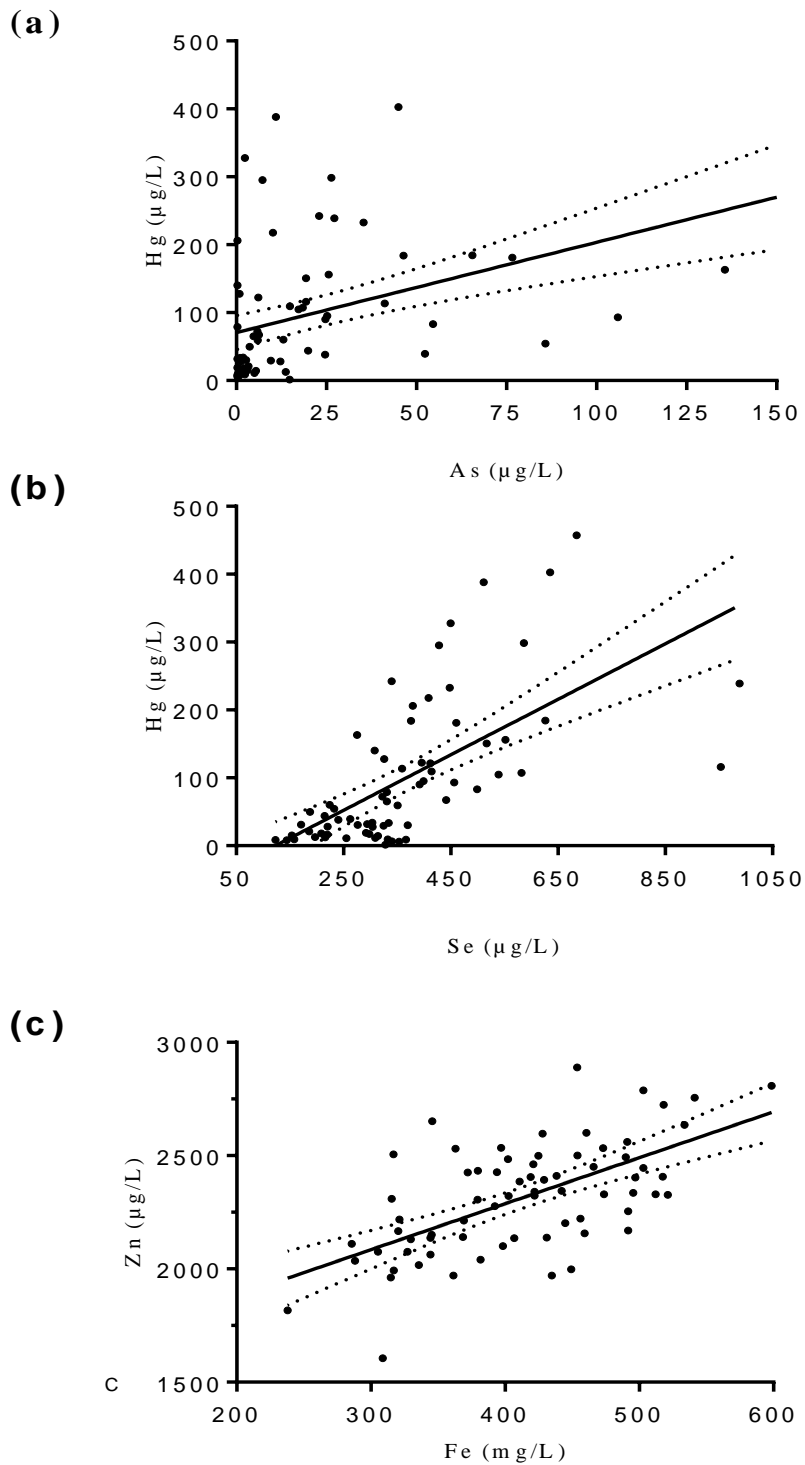


Figura 5. Representación gráfica de la correlación positiva significativa para la totalidad de las 70 muestras de sangre entre los pares de metales Hg-As (a), Hg-Se (b) y Fe-Zn (c). El valor del coeficiente de Spearman en R se expresa en cada gráfico ($p < 0,001$).



Cuando se efectuó el estudio de correlación evaluando la edad, el grupo adulto mostró un mayor número de correlaciones significativas ($n = 25$) en comparación con tan solo 9 en los pollos (**Tablas 18 y 19**). Respecto al sexo, no se observaron correlaciones significativas al utilizar todos los datos.

Al analizar ambos factores de forma simultánea (edad y sexo), se detectaron las mismas correlaciones, asociadas sobre todo a los adultos, en particular en los machos: 19 pares de elementos presentaban correlaciones significativas en machos adultos y 15 en hembras adultas. Por otro lado, el grupo de los pollos hembra fue el que mostró un menor número de correlaciones significativas, tan solo 5, mientras que los pollos macho presentaron un total de 8.

Tabla 18. Valores de «p» para la correlación de Spearman en el grupo de **adultos**.
En negrita valores de $p < 0,05$; (a): valores de $p < 0,001$.

	Cr	Cu	Mn	Ni	Zn	Se	As	Co	Cd	Hg	Pb
Fe	0,17	0,01	0,05	0,5	(a)	0,51	0,24	0,38	0,58	0,68	0,92
Cr		0,02	(a)	0,11	(a)	0,18	0,21	0,55	0,2	0,66	0,59
Cu			(a)	0,67	0,1	(a)	0	0,16	0,65	0,41	0,15
Mn				0,3	0,03	(a)	(a)	0,01	0,78	0,8	0,03
Ni					0,05	0,52	0,03	0,32	(a)	0,5	(a)
Zn						0,64	0,49	0,85	0,55	0,5	0,08
Se							(a)	0,1	0,86	(a)	0,01
As								0,02	0,27	(a)	(a)
Co									0,56	0,26	0,01
Cd										0,83	0,23
Hg											(a)



Tabla 19. Valores de «p» para la correlación de Spearman en el grupo de pollos.
En negrita valores de $p < 0,05$; (a): valores de $p < 0,001$.

	Cr	Cu	Mn	Ni	Zn	Se	As	Co	Cd	Hg	Pb
Fe	0,24	0,93	0,72	0,93	(a)	0,06	0,86	0,94	0,47	0,21	0,68
Cr		0,09	0,83	0,47	0,38	0,82	0,79	0,78	0,63	0,92	0,38
Cu			0,02	0,62	0,96	0,95	0,92	0,73	0,98	0,67	0,04
Mn				0,89	0,64	0,65	0,44	0,92	0,47	0,34	0,06
Ni					0,22	0,7	0,34	0,71	0,25	0,64	0,51
Zn						0,34	0,71	0,59	0,31	0,46	0,49
(a)Se							0,01	(a)	0,81	(a)	0,89
As								0,01	0,52	(a)	0,73
Co									0,77	0,08	0,86
Cd										0,43	0,01
Hg											0,97

I.4. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, el Fe fue el metal con mayores concentraciones, seguido del Zn, Cu, Se, Pb, Hg, Mn y As; Ni, Cr, Co y Cd presentaron las concentraciones más bajas. Se observó un orden similar (concentraciones más elevadas de Fe, seguidas de Zn, Cu, Cr, Ni, Pb y Cd) en ánades reales (*Anas platyrhynchos*) que habitan en zonas urbanas de Polonia. No se evaluó la presencia de Se, Hg, Mn, As ni Co en estos animales (Binkowski y Meissner, 2013). Las mayores concentraciones en Fe, Zn, Cu y Se eran esperadas, puesto que todos ellos son elementos esenciales y siempre se encuentran en mayores niveles que los elementos no esenciales como As, Cd y Hg, que mostraron una menor concentración en este estudio. El nivel extremadamente elevado de Fe (que tuvo que expresarse en mg/L en vez de en $\mu\text{g/L}$) es consecuencia del hecho de que la mayoría del Fe en el cuerpo está ligado a la hemoglobina, y en nuestro análisis utilizamos sangre total (incluyendo eritrocitos cargados con hemoglobina) en vez de plasma o suero, como se ha hecho en otros estudios (Kamiński *et al.*, 2008).

Los valores de Se obtenidos resultaron similares a los cuantificados en la sangre de pollos de cigüeña blanca del sur de España (382 $\mu\text{g/L}$) (Álvarez *et al.*, 2013), pero considerablemente superiores a los valores de las muestras extraídas de pollos de cigüeña



blanca en la misma región de España (Extremadura) (De la Casa-Resino *et al.*, 2014). Estas diferencias no resultan inusuales, ya que las concentraciones de Se en sangre indican una exposición reciente, dada su corta vida media en el torrente sanguíneo (37 días en el caso de los éideres de anteojos (*Somateria fischeri*) y 10 en ánades reales en cautividad (Grand *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2004). Si se aplicaran los niveles de fondo de Se (100-400 µg/L) propuestos por el Departamento de Interior de los Estados Unidos (Interior, 1998), casi un 30 % de las muestras (la mayoría de ellas de adultos) los sobrepasarían.

Los niveles de Cu en sangre de las cigüeñas blancas fueron, en líneas generales, similares o incluso inferiores a los registrados en ejemplares de otras zonas naturales de España (por ejemplo, en el Parque Nacional de Doñana, al suroeste del país) (Baos *et al.*, 2006b; Benito *et al.*, 1999) y, en todos los casos, inferiores a los encontrados en muestras extraídas de aves próximas a fuentes potenciales de contaminación por metales (Kamiński *et al.*, 2008; Van Eeden y Schoonbee, 1996). Las concentraciones de Cu en los tejidos pueden variar mucho a lo largo del año, y también pueden estar relacionadas con la contaminación ambiental (Kalisinska *et al.*, 2004; Parslow *et al.*, 1982), sobre todo si está provocada por actividades agrícolas que hagan uso de herbicidas y fungicidas con Cu (Binkowski y Sawicka-Kapusta, 2015). El valor máximo de Cu obtenido en este estudio (934.7 µg/L) estaba por debajo del valor mínimo (\approx 1880 µg/L) observado en la sangre de los ibis sagrados (*Threskiornis aethiopicus*) ubicados en zonas con altos niveles de contaminación, sin efectos crónicos o negativos aparentes sobre su supervivencia (Van Eeden y Schoonbee, 1996).

Al igual que se observó en el caso de Cu, los valores de Zn resultaron similares o incluso inferiores a aquellos obtenidos de las muestras extraídas a cigüeñas blancas de distintos lugares de España (Baos *et al.*, 2006b; Benito *et al.*, 1999; De la Casa-Resino *et al.*, 2014) y considerablemente más bajos que aquellos registrados en animales que habitan en zonas contaminadas de Polonia (Kamiński *et al.*, 2008). Las concentraciones de Zn en los tejidos se vieron afectadas por el mes en el que se recogieron las muestras (relacionado directamente con el ciclo de la muda) y por la cantidad de plantas en la dieta del animal (Parslow *et al.*, 1982). El envenenamiento por Zn se da con bastante frecuencia en la naturaleza y, en muchos casos, guarda relación con la ingesta de compuestos de Zn (Binkowski y Meissner, 2013), alcanzando unas concentraciones de plasma en aves intoxicadas que superan los 15 000 µg/L (Eisler, 1993). Además, se han observado valores de Se > 7500 µg/L en aves que habitan en zonas contaminadas (Falandysz *et al.*, 1988), que se alejan mucho de los valores cuantificados en el presente estudio.

Tan solo unos pocos estudios realizados sobre cigüeñas blancas han determinado sus niveles de Co, Fe y Mn en sangre, y todos ellos se han llevado a cabo en España (Benito *et al.*, 1999; De la Casa-Resino *et al.*, 2014) y Polonia (Kamiński *et al.*, 2008, 2009). Los niveles de Fe en las cigüeñas blancas analizadas en este estudio resultaron 10 veces superiores a las obtenidas en Polonia, pero las concentraciones fueron inferiores a las observadas en el resto de estos estudios.



Cr y Ni fueron los elementos con mayores concentraciones indetectables: el 57 % y el 35 % eran < LD, respectivamente. Este hecho también se ha observado en ánades reales de zonas urbanas de Polonia con porcentajes similares (Binkowski y Meissner, 2013), y este trabajo ha sido el único que hemos podido encontrar en el que se informe de niveles de Cr en sangre de aves (valores medios < 100 µg/L). Otros autores, como Burger y Gochfeld (2009), descubrieron que los niveles de Cr en las plumas de ciertas especies de aves son mayores que los niveles de As y Cd. Los niveles medios de Ni en sangre resultaron ser muy inferiores a aquellos hallados en los ibis sagrados provenientes de una zona con altos niveles de contaminación por metales ($\approx 1780-17\ 120$ µg/L) (Van Eeden y Schoonbee, 1996).

A pesar de que el Ni y el Cr desempeñan papeles fisiológicos en los animales (Binkowski y Meissner, 2013), prácticamente no existen referencias en la literatura acerca de sus efectos y de sus concentraciones basales en aves. Además, a partir de estudios experimentales realizados sobre aves, el Cr se considera teratogénico, mutagénico y carcinogénico (Eisler, 1986). En niveles elevados, el Ni puede provocar efectos adversos sobre la salud (Mansouri y Hoshyari, 2012), como una disminución del crecimiento en pollos de engorde (Weber y Reid, 1968).

Las concentraciones de As resultaron similares a las halladas en ciconiiformes en España (Baos *et al.*, 2006b; Benito *et al.*, 1999; De la Casa-Resino *et al.*, 2014). Cabe señalar que la información disponible sobre el valor umbral de este metaloide en la sangre de pollos y volantes resulta limitada, pero algunos autores han indicado valores de As de 20 µg/L como valor de referencia para zonas no contaminadas (Burger y Gochfeld, 1997a). Si se toma en consideración este valor umbral, lo superan un 26 % de las muestras del presente estudio, lo que indica una posible situación de riesgo para la población analizada; sin embargo, los autores antes mencionados establecieron que existe una gran variabilidad entre especímenes de una misma especie.

Respecto al Hg, sus concentraciones eran superiores a las declaradas previamente por De la Casa-Resino *et al.* (2014) en pollos de la misma especie, con valores medios de Hg en sangre que oscilaban entre 8,89 µg/L en una zona natural, no contaminadas, y 53,1 µg/L en aquellas más próximas a un vertedero o con una intensa actividad agrícola. No obstante, los valores de Hg hallados en el presente estudio se mantuvieron en todo momento por debajo de los 1000 µg/L, que se ha establecido como valor umbral para una situación de riesgo para las aves (Álvarez *et al.*, 2013; Evers *et al.*, 2008), indicando así que los niveles de Hg eran lo suficientemente bajos como para suponer un riesgo para cualquiera de estas aves. Además, si se tiene en cuenta que el Hg se transporta por el torrente sanguíneo a otros tejidos, y que las concentraciones en sangre probablemente muestren una exposición reciente a Hg, los bajos niveles registrados podrían indicar la ausencia de altas concentraciones de este contaminante en el ecosistema de estudio (Gariboldi *et al.*, 2001).

De todos los elementos, los niveles de Cd ($1,05 \pm 2,41$ µg/L) fueron los que presentaron un mayor coeficiente de variación (229,5 %), y un alto porcentaje (30 %) de las muestras se encontraban por debajo del LD (0,25 µg/L). Esos niveles se aproximaban a los



registrados en la sangre de las cigüeñas blancas del Parque Nacional de Doñana en 1999 y a las de la región de Murcia en 1996, ambas en España (García-Fernández *et al.*, 1996; Benito *et al.*, 1999), así como a las de las zonas no contaminadas de Polonia (Kamiński *et al.*, 2008, 2009). Sin embargo, estos valores resultaron superiores a los observados en el Parque Nacional de Doñana de 1999 a 2002 (Baos *et al.*, 2006a, b). Al comparar los valores individuales con los valores de referencia existentes en la literatura para zonas no contaminadas ($1 \mu\text{g/L}$) (García-Fernández *et al.*, 1995), solo 12 de los animales superaban ese valor de referencia (de los cuales solo 3 registraron $> 5 \mu\text{g/L}$).

El Pb es uno de los metales más tóxicos y uno de los más estudiados en varias especies de aves. El Pb puede afectar a todos los sistemas corporales, reduciendo el crecimiento y el éxito de la reproducción, causando anemia hemolítica y un hematocrito bajo, y provocando efectos patológicos en el sistema inmunológico y en el comportamiento del animal afectado (Franson y Pain, 2011). Se detectó Pb en todas las muestras analizadas, pero la media de Pb en la sangre de los pollos y de los adultos se encontró por debajo de $200 \mu\text{g/L}$, que se considera un nivel de fondo para los falconiformes (Franson y Pain, 2011). En consecuencia, cabe destacar que 3 muestras (un 4.5 % del total) superaron este límite umbral asociado a los pollos que aún no han abandonado el nido. Además, Scheuhammer (1987) estableció que unas concentraciones de Pb de $150 \mu\text{g/L}$ en sangre podrían indicar la ausencia de una exposición anómala a Pb (Scheuhammer, 1987), y tan solo un 18 % de los animales del presente estudio superan ese límite. No obstante, cabe señalar que no hay mucha información acerca de los umbrales de toxicidad específicos de Pb en ciconiiformes (Franson, 1996). Las concentraciones de Pb obtenidas en el presente estudio resultan similares, o apenas ligeramente superiores, a las registradas por otros autores en diferentes trabajos realizados en España y Polonia (Benito *et al.*, 1999; De la Casa-Resino *et al.*, 2014, 2015a; Kamiński *et al.*, 2008, 2009). Baos *et al.* (2006) descubrieron unos niveles medios de Pb en sangre de $90,7 \mu\text{g/L}$ (bastante parecidos a los obtenidos en este estudio) en pollos de cigüeña blanca provenientes de una colonia de referencia localizada también en la provincia de Cáceres, en una zona natural lejos de ambientes urbanos y de otras fuentes evidentes de contaminación (no se especificaba el lugar exacto). Se detectaron valores elevados en pollos de cigüeñas blancas provenientes de distintas zonas de la provincia de Madrid (España) (Cabo *et al.*, 2012), con niveles de Pb en sangre que oscilaban entre 105 y $222,6 \mu\text{g/L}$, que se correspondían con los mayores niveles en una zona caracterizada por la presencia de actividad industrial y de varios vertederos. También se detectaron niveles más altos en crías de cigüeña blanca del suroeste de España tras un importante vertido accidental (con una media de $168 \mu\text{g/L}$) (Meharg *et al.*, 2002), que podría ser consecuencia de la transmisión de Pb de la madre al huevo y/o de su presencia en la comida recolectada en las zonas contaminadas para alimentar a los polluelos.

Por último, cabe señalar que las concentraciones en sangre de los elementos tóxicos Cd, Hg y Pb señalan con claridad la existencia de contaminación, y pueden ser indicadores claros de una exposición reciente (Carneiro *et al.*, 2015), a pesar de que para muchas especies (como, por ejemplo, la cigüeña blanca) no existen umbrales de toxicidad comúnmente aceptados. Sin embargo, todos los elementos inorgánicos ejercen efectos



tóxicos en las aves cuando participan en reacciones bioquímicas inusuales. El umbral de concentración en el que tienen lugar los efectos tóxicos suele ser más elevado para los elementos esenciales que para los no esenciales; no obstante, algunos elementos esenciales tan solo necesitan incrementar ligeramente su concentración para resultar tóxicos, y muchas sustancias químicas no pueden descomponerse en compuestos menos tóxicos (Kamiński *et al.*, 2009).

1.4.1. La influencia de la edad y del sexo

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la edad en las concentraciones sanguíneas de cinco elementos. Los pollos presentaron valores más bajos de Ni, Cu, Se y Hg (todos con $p < 0,001$) que los adultos, pero registraron valores más elevados de Pb ($p < 0,01$). Este último hallazgo resulta inusual, ya que lo habitual es que los niveles de Pb en sangre sean más elevados en adultos que en jóvenes, como se ha determinado con frecuencia (Carneiro *et al.*, 2014; Eskilden y Grandjean, 1984; Furness, 1993; Sebastiano *et al.*, 2016). Debido a que los valores de Pb en sangre reflejan una ingesta alimentaria inmediata, estas diferencias observadas entre los grupos de edad podrían tener su explicación en los comportamientos alimentarios (Burger y Gochfeld 1997a).

Se han documentado diferencias según la edad en lo relativo a residuos de metales para una serie de organismos y contaminantes (Furness, 1993; Honda *et al.*, 1990). Más concretamente, existen diferencias en aves según su edad debido a que ciertos contaminantes inorgánicos se acumulan en el tejido interno de los vertebrados, principalmente en los huesos, órganos o grasa (por ejemplo, las aves tienden a la bioacumulación de metales pesados) (Furness, 1993). La otra explicación posible para la diferencia de acumulación en relación a la edad de las aves de una misma colonia es que las aves adultas y las jóvenes ingieren alimentos distintos, comen proporciones diferentes de la misma comida y sus cuerpos liberan los metales de manera distinta (Burger y Gochfeld, 1997a). Además, en el caso de ciertos metales concretos (como el Hg), además de la ingesta alimentaria, su concentración en sangre indica influencias fisiológicas tales como la movilización y acumulación en plumas y huevos (Furness, 1993; Burger y Gochfeld, 1997b). De hecho, durante el período de producción de plumaje, el Hg se incorpora a la estructura de queratina de las plumas, reduciendo así el nivel de Hg en sangre (Dauwe *et al.*, 2000). Esto podría explicar los bajos niveles detectados en pollos en comparación con adultos, tal y como se ha determinado en aves de presa, como el busardo ratonero (*Buteo buteo*) (Carneiro *et al.*, 2014) y en aves marinas, como la gaviota de Franklin (*Larus pipixcan*) y el rabihorcado real (*Fregata magnificens*) (Sebastiano *et al.*, 2016). También se ha detectado una influencia de la edad en estudios similares con diferentes especies de aves, pero con otros elementos: Cd, Ni y Fe (García-Fernández *et al.*, 1996; Kamiński *et al.*, 2006; Lucia *et al.*, 2010; Carneiro *et al.*, 2014); todos los casos indicaban una relevancia potencial de este factor endógeno para futuros estudios de biomonitorización.

Cuando se analizó el efecto del sexo, se determinó que este factor no influía de manera significativa en ninguna de las concentraciones de metales. Sin embargo, cabe mencionar



que las hembras de ambos grupos (pollos y adultos) mostraron concentraciones inferiores de Cr, de lo que Binkowski y Meissner (2013) también informaron en ánades reales. En estudios previos, se concluyó que el sexo influía en las concentraciones de As en el ánsar común (*Anser anser*) (Lucia *et al.*, 2010), en el que se detectaron unas mayores concentraciones en las hembras. Por otro lado, otro estudio demostró que los niveles de Hg en sangre resultaban considerablemente superiores en los busardos ratoneros hembras que en los machos (Carneiro *et al.*, 2014), mientras que este factor no afectó a los niveles de As y Pb. Un estudio desarrollado en Polonia con cigüeñas blancas determinó que el sexo no influía en las concentraciones de Cd en sangre, pero sí tenía un ligero efecto en las de Pb, registrando unas concentraciones sanguíneas mayores en las hembras que en los machos; no obstante, tales diferencias no presentaban diferencias estadísticamente significativas (Kamiński *et al.*, 2015). Resultados similares respecto al Pb se encontraron también en cisnes vulgares adultos (*Cygnus olor*) (Eskildsen y Grandjean, 1984).

1.4.2. Correlaciones

Cabe indicar que la acumulación de ciertos elementos esenciales puede resultar afectada por una exposición elevada a otros elementos, sean o no esenciales. En consonancia, en el presente estudio se hallaron correlaciones de una alta relevancia estadística ($p < 0.001$) entre los pares Fe-Zn ($r = 0.573$), Hg-Se ($r = 0.707$) y Hg-As ($r = 0.571$). La acumulación de Se en los tejidos expuestos a Hg es un fenómeno de sobra conocido (Cuvín-Aralar y Furness, 1991; Yang *et al.*, 2008). Una de las explicaciones de esta relación puede ser la acción protectora que el Se ejerce contra la toxicidad del Hg, habiéndose descrito la formación de un complejo estable e inerte entre el selenito y el Hg^{2+} en mamíferos (Yang *et al.*, 2008). Correlaciones como esta entre metales esenciales y no esenciales podrían indicar una implicación de los metales esenciales en la detoxificación de metales no esenciales (Blanco *et al.*, 2003; De la Casa-Resino *et al.*, 2014; Kamiński *et al.*, 2006). En la literatura consultada no se han encontrado referencias relativas a la correlación o a la interacción entre los pares Hg-As y Fe-Zn.

La mayoría de las correlaciones significativas se observaron en el grupo de machos adultos, mientras que el grupo de pollos hembras fue el que menos registró. Este hallazgo resulta compatible con el hecho de que la mayoría de los elementos son acumulativos, y los adultos acumulan metales a lo largo de un mayor período de tiempo (Berglund *et al.*, 2011; Furness, 1993), incrementando así la posibilidad de que se produzcan interacciones entre elementos acumulados, como Hg y Se. Las correlaciones de la mayoría de los elementos en sangre de las cigüeñas blancas adultas fueron mayores que las de los pollos, y la mayor correlación se observó en la pareja Hg-Se.

1.5. CONCLUSIÓN

Este estudio se incorpora al creciente cuerpo de literatura científica que determina los niveles en sangre de distintos elementos inorgánicos, que resultan de utilidad para futuros programas de biomonitorización, utilizando a la cigüeña blanca como especie adecuada y susceptible. Nuestro estudio es el primero en informar de los niveles de 12 elementos



presentes en la sangre de la cigüeña blanca en Europa. Varios elementos (Cu, Ni, Pb, Se y Hg) reflejaron acumulaciones diferentes en adultos y pollos, por lo que debe ponerse un especial cuidado al analizar dichos elementos para distinguir entre aves jóvenes y adultas durante la biomonitorización. Respecto al sexo, no se observó una influencia clara sobre los resultados obtenidos.

I.6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. José Luis Rodríguez, del Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura (Cáceres, España), el apoyo en la determinación del sexo, y al personal del Centro de Recuperación de Fauna de Los Hornos (Junta de Extremadura, Cáceres, España) la colaboración en la realización del muestreo.

Esta investigación contó con el apoyo parcial de la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura (Ayuda GR15114, España) y de fondos FEDER a través del Programa Programa Operativo FEDER (2014-2020) de Extremadura.

I. 7. REFERENCIAS

- Alvarez C.R., Moreno M.J., Alonso L.L., Gómara B., Bernardo F.J.G., Martín-Doimeadios R.C.R., González M.J. (2013). Mercury, methylmercury, and selenium in blood of bird species from Doñana national park (Southwestern Spain) after a mining accident. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20(8), 5361-5372.
- Baos R., Bias J., Bortolotti G.R., Marchant T.A., Hiraldo F. (2006a). Adrenocortical response to stress and thyroid hormone status in free-living nestling white storks (*Ciconia ciconia*) exposed to heavy metal and arsenic contamination. *Environ. Health Perspect.* 114(10), 1497-1501.
- Baos R., Jovani R., Pastor N., Tella J.L., Jiménez B., Gómez G. *et al.* (2006b). Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(10), 2794-2803.
- Benito V., Devesa V., Munoz O., Suner M.A., Montoro, Baos R., Hiraldo F., Ferrer M., Fernandez M., Gonzalez M.J. (1999). Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcollar mine. *Sci. Total Environ.* 242: 309-323.
- Berglund Å.M., Koivula M., Eeva T. (2011). Species-and age-related variation in metal exposure and accumulation of two passerine bird species. *Environ. Pollut.* 159(10), 2368-2374.
- Beyer W.N., Spann J.W., Sileo L., Franson J.C. (1988). Lead poisoning in six captive avian species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17(1), 121-130.
- Binkowski L.J., Meissner W. (2013). Levels of metals in blood samples from mallards (*Anas platyrhynchos*) from urban areas in Poland. *Environ. Pollut.* 178, 336-342.



- Binkowski T.J., Sawicka-Kapusta K. (2015). Lead poisoning and its in vivo biomarkers in Mallard and Coot from two hunting activity areas in Poland. *Chemosphere* 127, 101-108.
- Blanco G., Frias O., Jimenez B., Gomez G. (2003). Factors influencing variability and potential uptake routes of heavy metals in black kites exposed to emissions from a solid-waste incinerator. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(11), 2711-2718.
- Blázquez E., Aguirre J., Martínez-Haro M., Mateo R., Jiménez B. (2006). The use of white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings in a biomonitoring programme for organochlorines through the region of Madrid (Spain). *Organohalogen Compounds* 68, 2081-2084.
- Burger J., Gochfeld M. (1997a). Age differences in metals in the blood of herring (*Larus argentatus*) and franklin's (*Larus pipixcan*) gulls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33(4), 436-440.
- Burger J., Gochfeld M. (1997b). Risk, mercury levels, and birds: Relating adverse laboratory effects to field biomonitoring. *Environ. Res.* 75(2), 160-172.
- Burger J., Gochfeld M. (2009). Comparison of arsenic, cadmium, chromium, lead, manganese, mercury and selenium in feathers in bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*), and comparison with common eider (*Somateria mollissima*), glaucous-winged gull (*Larus glaucescens*), pigeon guillemot (*Cepphu scolumba*), and tufted puffin (*Fratercula cirrhata*) from the aleutian chain of Alaska. *Environ. Monit. Assess.* 152(1-4), 357-367.
- Cabo P., Espín S., Martínez-López E., Roscales J.L., Jiménez B., García-Fernández A.J. (2012). Metales pesados en sangre de pollos de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) de Madrid y Aragón. *Revista de Toxicología* 29(1), 72.
- Carneiro M., Colaço B., Brandao R., Ferreira C., Santos N., Soeiro V., Colaço A., Pires M.J., Oliveira P.A., Lavín S. (2014). Biomonitoring of heavy metals (Cd, Hg, and Pb) and metalloid (As) with the portuguese common buzzard (*Buteo buteo*). *Environ. Monitor. Assess.* 186(11), 7011-7021.
- Carneiro M., Colaço B., Brandão R., Azorín B., Nicolas O., Colaço J., Pires M.J., Agustí S., Casas-Díaz E., Lavín S., Oliveira P.A. (2015). Assessment of the exposure to heavy metals in griffon vultures (*Gyps fulvus*) from the Iberian Peninsula. *Ecotox. Environ. Safe.* 113, 295-301.
- Clarke J.U. (1998). Evaluation of censored data methods to allow statistical comparisons among very small samples with below detection limit observations. *Environ. Sci. Technol.* 32(1), 177-183.
- Cuvín-Aralar M.L.A, Furness R.W. (1991). Mercury and selenium interaction: A review. *Ecotox. Environ. Safe.* 21(3), 348-364.
- Dauwe T., Bervoets L., Blust R., Pinxten R., Eens M. (2000). Can excrement and feathers of nestling songbirds be used as biomonitors for heavy metal pollution? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39(4), 541-546.
- De la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Pérez-López M., Soler F. (2014). Breeding near a landfill may influence blood metals (Cd, Pb, Hg, Fe, Zn) and metalloids (Se, As) in white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings. *Ecotoxicology* 23(8), 1377-1386.



- De la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Pérez-López M., Soler F. (2015a). Chlorinated pollutants in blood of white stork nestlings (*Ciconia ciconia*) in different colonies in Spain. *Chemosphere* 118, 367-372.
- De la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Soler Rodríguez F., Pérez-López M. (2015b). Biomarkers of oxidative status associated with metal pollution in the blood of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain. *Toxicol. Environ. Chem.* 97(5), 588-598.
- Eeva T., Ahola M., Lehtikoinen E. (2009). Breeding performance of blue tits (*Cyanistes caeruleus*) and great tits (*Parus major*) in a heavy metal polluted area. *Environ. Pollut.* 157(11), 3126-3131.
- Eisler R. (1986). Chromium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. Fish and Wildlife Service, US Department of the Interior.
- Eisler R. (1993). Zinc hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. *Biological Report* 10, 33-47.
- Eskildsen J., Grandjean P. (1984). Lead exposure from lead pellets: Age-related accumulation in mute swans. *Toxicol. Lett.* 21(2), 225-229.
- Evers D.C., Savoy L.J., DeSorbo C.R., Yates D.E., Hanson W., Taylor K.M. *et al.* (2008). Adverse effects from environmental mercury loads on breeding common loons. *Ecotoxicology* 17(2), 69-81.
- Falandysz J., Jakuczun B., Mizera T. (1988). Metals and organochlorines in four female white-tailed eagles. *Mar. Pollut. Bull.* 19(10), 521-526.
- Florea A., Büsselberg D. (2006). Occurrence use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *Biometals* 19(4), 419-427.
- Fossi C., Leonzio C. (1993). Nondestructive biomarkers in vertebrates. CRC Press.
- Franson J.C. (1996). Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. En: Beyer WN, Heinz GH, Redmon-Norwood AW (eds.), Environmental contaminants in wildlife. Interpreting tissue concentrations, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 265-279.
- Franson J.C., Pain D.J. (2011). Lead in birds. En: Beyer W.N., Meador J.P. (eds.), Environmental contaminants in biota. Interpreting tissue concentrations. Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp. 563-593.
- Furness R. (1993). Birds as monitors of pollutants. En: Furness R., Greenwood J. (eds.), Birds as monitors of environmental change. Chapman and Hall, London, pp. 86-131.
- García Fernández A.J., Sánchez-García J.A., Jiménez Montalbán P., Luna A. (1995). Lead and cadmium in wild birds in southeastern Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 14(12), 2049-2058.
- García-Fernández A., Sánchez-García J., Gómez-Zapata M., Luna A. (1996). Distribution of cadmium in blood and tissues of wild birds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30(2), 252-258.
- Gariboldi J.C., Bryan A.L., Jagoe C.H. (2001). Annual and regional variation in mercury concentrations in wood stork nestlings. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(7), 1551-1556.



- Gaunt A.S., Oring L.W., Council O. (1997). Guidelines to the use of wild birds in research. Ornithological Council Washington, D.C.
- Gómez G., Baos R., Gómara B., Jiménez B., Benito V., Montoro R., Hiraldo F., González M.J. (2004). Influence of a mine tailing accident near Doñana National Park (Spain) on heavy metals and arsenic accumulation in 14 species of waterfowl (1998 to 2000). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 521–529.
- Grand J.B., Franson J.C., Flint P.L., Petersen M.R. (2002). Concentrations of trace elements in eggs and blood of spectacled and common eiders on the Yukon-Kuskokwim delta, Alaska, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(8), 1673-1678.
- Griffiths R., Daan S., Dijkstra C. (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 263(1374), 1251-1256.
- Hernández L.M., Gómara B., Fernández M., Jiménez B., González M., Baos R., Hiraldo F., Ferrer M., Benito V., Suñer M.A., Devesa V., Muñoz O., Montoro R. (1999). Accumulation of heavy metals and As in wetland birds in the area around Doñana National park affected by the Aznalcollar toxic spill. *Sci. Total Environ.* 242(1), 293-308.
- Hofer C., Gallagher F.J., Holzapfel C. (2010). Metal accumulation and performance of nestlings of passerine bird species at an urban brownfield site. *Environ. Pollut.* 158(5), 1207-1213.
- Honda K., Min B.Y., Tatsukawa R. (1986). Distribution of heavy metals and their age-related changes in the eastern great white egret, *Egretta alba modesta*, in Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15(2), 185-197.
- Honda K., Marcovecchio J.E., Kan S., Tatsukawa R., Ogi H. (1990). Metal concentrations in pelagic seabirds from the North Pacific Ocean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19(5), 704-711.
- Interior USD. (1998). Guidelines for interpretation of the biological effects of selected constituents in biota, water, and sediment. Selenium. En: National Irrigation Water Quality Program Information Report No 3 (Ed.) United States Department of the Interior. GRA and I.
- Kalisińska E., Salicki W., Mysłek P., Kavetska K.M., Jackowski A. (2004). Using the mallard to biomonitor heavy metal contamination of wetlands in north-western Poland. *Sci. Total Environ.* 320(2), 145-161.
- Kamiński P., Kurhalyuk N., Kasprzak M., Szady-Grad M., Jerzak L. (2006). Dynamics of chemical elements in the blood of white stork *Ciconia ciconia* chicks from polluted environments in W Poland. En: Tryjanowski P., Sparks T.H., Jerzak L. (eds.), The white stork in Poland: Studies in biology, ecology and conservation. Poznań: BoguckiWydawnictwoNaukowe, pp. 201-211.
- Kamiński P., Kurhalyuk N., Szady-Grad M., Tkachenko H., Kasprzak M., Jerzak L. (2008). Chemical elements in the blood of white stork *Ciconia ciconia* chicks in differential Poland regions. *Med. and Biol. Sci.* 22(4), 31-37.
- Kamiński P., Kurhalyuk N., Jerzak L., Kasprzak M., Tkachenko H., Klawe J.J., Szady-Grad M., Koim B., Wiśniewska E. (2009). Ecophysiological determinations of antioxidant



- enzymes and lipoperoxidation in the blood of white stork *Ciconia ciconia* from Poland. *Environ. Res.* 109(1), 29-39.
- Kamiński P., Grochowska E., Mroczkowski S., Jerzak L., Kasprzak M., Koim-Puchowska B., Woźniak A., Ciebiera O., Markulak D. (2015). Sex ratio of white stork *Ciconia ciconia* in different environments of Poland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22(17), 13194-13203.
- Koivula M.J., Eeva T. (2010). Metal-related oxidative stress in birds. *Environ. Pollut.* 158(7), 2359-237.
- Lucia M., André J., Gontier K., Diot N., Veiga J., Davail S. (2010). Trace element concentrations (mercury, cadmium, copper, zinc, lead, aluminium, nickel, arsenic, and selenium) in some aquatic birds of the southwest Atlantic coast of France. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58(3), 844-853.
- Mansouri B., Hoshyari E. (2012). Nickel concentration in two bird species from Hara biosphere reserve of southern Iran. *Chinese Birds* 3(1), 54-59.
- Meharg A.A., Pain D.J., Ellam R.M., Baos R., Olive V., Joyson A. Powell N., Green A.J., Hiraldo F. (2002). Isotopic identification of the sources of lead contamination for white storks (*Ciconia ciconia*) in a marshland ecosystem (Doñana, SW Spain). *Sci. Total Environ.* 300(1), 81-86.
- Merian E. (1991). Metals and their compounds in the environment: Occurrence, analysis and biological relevance. VCH VerlagsgesellschaftmbH.
- Parslow J., Thomas G., Williams T. (1982). Heavy metals in the livers of waterfowl from the Ouse Washes, England. *Environ. Pollut. A* 29(4), 317-327.
- Peakall D., Burger J. (2003). Methodologies for assessing exposure to metals: Speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotox. Environ. Safe.* 56(1), 110-121.
- Pérez-López M., De la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Galeano J., Míguez-Santiyán M.P., de Castro-Lorenzo A., Soler F. (2016). Concentrations of metals, metalloids, and chlorinated pollutants in blood and plasma of white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings from Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 313-321.
- Scheuhammer A. (1987). The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: a review. *Environ. Pollut.* 46(4), 263-295.
- Sebastiano M., Bustamante P., Costantini D., Eulaers I., Malarvannan G., Méndez-Fernández P., Churlaud C., Blévin P., Hauselmann A., Dell'Omo G., Covaci A, Eens M., Chastel O. (2016). High levels of mercury and low levels of persistent organic pollutants in a tropical seabird in French Guiana, the magnificent frigatebird, *Fregata magnificens*. *Environ. Pollut.* 214, 384-393.
- Tkachenko H., Kurhaluk N. (2012). Pollution-induced oxidative stress and biochemical parameter alterations in the blood of white stork nestlings *Ciconia ciconia* from regions with different degrees of contamination in Poland. *J. Environ. Monitor.* 14(12), 3182-3191.
- Van Eeden P., Schoonbee H. (1996). Metal concentrations in liver, kidney, bone and blood of three species of birds from a metal-polluted wetland. *SA Waterbulletin* 22, 351-358



- Weber C., Reid B. (1968). Nickel toxicity in growing chicks. *J. Nutr.* 95, 612-616.
- Wilson H.M., Petersen M.R., Troy D. (2004). Concentrations of metals and trace elements in blood of spectacled and king eiders in northern Alaska, USA. *Environ. Tox Chem.* 23(2), 408-414.
- Yang D., Chen Y., Gunn J.M., Belzile N. (2008). Selenium and mercury in organisms: Interactions and mechanisms. *Environ. Rev.* 16(NA), 71-9



CAPÍTULO II

Efecto del plomo en sangre sobre la actividad enzimática Δ -ALAD, el hematocrito y los niveles de hemoglobina en la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*).



RESUMEN

El plomo (Pb) ejerce su actividad mediante inhibición de la enzima dehidratasa del ácido delta-aminolevulínico (Δ -ALAD), alterando el grupo hemo de la hemoglobina (Hb), lo que da lugar a una reducción de la cantidad de glóbulos rojos (anemia). Por ello, la Δ -ALAD está considerada como biomarcador de la exposición a Pb. El objetivo principal de este estudio fue investigar la relación entre la actividad enzimática Δ -ALAD y la concentración de Pb, y los efectos sobre los niveles de Hb y hematocrito (Hct) en sangre de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*). Para ello, se determinaron todos esos parámetros en sangre de ejemplares adultos (n=22), juveniles (n=10) y pollos (n=95), y se estudió la relación entre ellos. Las muestras de adultos y juveniles procedieron de un Centro de recuperación, y las de los pollos de 3 colonias situadas en diferentes lugares de la provincia de Cáceres (Extremadura, España).

El rango de las concentraciones de Pb fue muy amplio (5,52-780,5 $\mu\text{g/L}$), aunque casi el 46% de las muestras presentaron valores inferiores a 50 $\mu\text{g/L}$. La actividad enzimática Δ -ALAD mostró una alta sensibilidad a la exposición a diferentes niveles de Pb, con una inhibición dosis-dependiente. Esta correlación negativa fue evidente en todo el rango de concentraciones, si bien fue mucho más intensa cuando el Pb en sangre era $>200 \mu\text{g/L}$. No se encontró correlación significativa entre Pb y Hb, pero sí una correlación positiva entre Pb y Hct. La actividad Δ -ALAD y el Hct mostraron una correlación negativa significativa, sobre todo cuando los niveles de Pb eran ≥ 100 y $< 200 \mu\text{g/L}$. Los valores de Pb en sangre $< 100 \mu\text{g/L}$ no afectaron significativamente a la concentración de Hct y Hb.

Los resultados demuestran que la actividad Δ -ALAD es un biomarcador bioquímico de la exposición a Pb en sangre de cigüeña blanca, mucho más sensible que la determinación del Hct o de la Hb (biomarcadores de efecto). Se ha comprobado que a partir de 30 $\mu\text{g/L}$ de Pb, la actividad Δ -ALAD se inhibe significativamente respecto a valores inferiores considerados de referencia ($< 20 \mu\text{g/L}$), por lo que se puede considerar 30 $\mu\text{g/L}$ de Pb en sangre como umbral de efecto inhibitorio sobre la actividad Δ -ALAD sanguínea en la cigüeña blanca, indicando que esta especie es más sensible que otras especies de aves.

ABSTRACT

Lead (Pb) inhibits the delta-aminolaevulinic acid dehydrate enzyme activity (Δ -ALAD), altering the haemoglobin heme group (Hb), resulting in a reduction in the amount of red blood cells (anaemia). Therefore, Δ -ALAD is a biomarker of exposure to Pb. The main objective of this study was to investigate the relationship between Δ -ALAD enzymatic activity and Pb concentration, and the effects on Hb and hematocrit (Hct) levels in white stork (*Ciconia ciconia*) blood. For this purpose, all these parameters on adult (n=22), juvenile (n=10) and chicken (n=95) blood were determined, and the relationship among them was studied. Both adult and juvenile samples came from a Recovery Centre, and those from chicks from 3 colonies located in different locations in the province of Cáceres (Extremadura, Spain).

The range of Pb concentrations was very wide (5.52-780.5 $\mu\text{g/L}$), although almost 46%



of the samples had values less than 50 $\mu\text{g/L}$. Δ -ALAD enzymatic activity showed a high sensitivity to exposure to different levels of Pb, with a dose-dependent inhibition. This negative correlation was evident throughout the range of concentrations, although it was much more intense when blood Pb was $>200 \mu\text{g/L}$. No significant correlation was found between Pb and Hb, but a positive correlation between Pb and Hct. Δ -ALAD activity and Hct showed a significant negative correlation, especially when Pb levels were ≥ 100 and $<200 \mu\text{g/L}$. Blood Pb values of $<100 \mu\text{g/L}$ did not significantly affect the concentration of Hct and Hb.

The results show that Δ -ALAD activity is a biochemical biomarker of exposure to Pb in white stork blood, much more sensitive than Hct or Hb determination (effect biomarkers). Up to 30 $\mu\text{g/L}$ of Pb, Δ -ALAD activity has been significantly inhibited from lower reference values ($<20 \mu\text{g/L}$), so 30 $\mu\text{g/L}$ of Pb in blood can be considered as an inhibitory effect threshold on Δ -ALAD blood activity in white stork, thus indicating that this species is more sensitive than other bird species.

II.1. INTRODUCCIÓN

El plomo (Pb) es un metal no esencial, conocido por sus propiedades altamente tóxicas, prácticamente omnipresente debido a distintas actividades antropogénicas (Franson y Pain, 2011). Aunque se ha reducido la cantidad de Pb que ingresa en el medio ambiente por distintas normas legales y su eliminación de las tuberías, la gasolina y las pinturas, otras fuentes de contaminación, como las municiones de Pb, siguen siendo un peligro para las especies silvestres (Williams *et al.*, 2017). La toxicidad del Pb se asocia a su alta persistencia, ya que puede acumularse en el medio ambiente y en su biota, con posibilidad de producirse biomagnificación en la cadena trófica (Martínez-López *et al.*, 2004). Debido a esto, los efectos negativos del Pb pueden perpetuarse durante muchos años después de que se hayan detenido las emisiones al medio ambiente (Berglund *et al.*, 2010).

La concentración de Pb y otros metales se puede medir directamente en la sangre y en diversos tejidos de aves (Binkowski y Sawicka-Kapusta, 2015). Sin embargo, evaluar las respuestas biológicas a la exposición y acumulación de metales mediante biomarcadores puede ser una forma más directa de medir las alteraciones causadas por metales en animales (a niveles bioquímicos y fisiológicos), por lo que pueden ser muy útiles en Ecotoxicología (Vanparys *et al.*, 2008). Los biomarcadores permiten controlar de forma no invasiva y objetiva la susceptibilidad, la exposición y el efecto de las sustancias en los animales (Bernard, 2008). El Pb sanguíneo inhibe la actividad de varias enzimas implicadas en la formación del grupo hemo, siendo la enzima sanguínea deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico (Δ -ALAD) o porfobilinógeno sintasa (EC 4.2.1.24) la primera en verse afectada y la más sensible, por lo que es considerada como un biomarcador específico y sensible de Pb (Espín *et al.*, 2015; Rodríguez-Estival *et al.*, 2012). La Δ -ALAD es una de las enzimas que intervienen en la formación del grupo hemo de la hemoglobina (Hb), siendo su función la de catalizar la condensación de dos moléculas de ácido aminolevulínico (ALA) en una molécula de porfobilinógeno (PBG), que es una



porfirina necesaria para la síntesis de hemoglobina (Hb) (Espín *et al.*, 2015; Peixoto *et al.*, 2003).

Cuando la actividad de Δ -ALAD es inhibida por Pb, la síntesis del grupo hemo se ve alterada y, en consecuencia, la concentración de Hb puede disminuir dando lugar a anemia (Alaya-Ltifi *et al.*, 2015; Binkowski y Sawicka-Kapusta, 2015; Franson y Pain, 2011). La inhibición de la actividad enzimática de Δ -ALAD también origina la acumulación de ALA, que puede oxidarse induciendo la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Espín *et al.*, 2015; Martínez-Haro *et al.*, 2011). Las ROS pueden producir peroxidación lipídica de la membrana eritrocitaria y dar lugar a hemólisis y anemia, lo que potencia la acción tóxica sobre la sangre (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011). Ya que el Pb puede afectar a la Hb y el hematocrito (Hct) estos parámetros hematológicos se han utilizado como indicadores de intoxicación por plomo (Pain, 1989).

Las aves son una opción adecuada y atractiva como biomonitores o especies centinela indicativas de un cambio ambiental específico (Becker, 2003), especialmente las especies en las posiciones superiores de las cadenas alimentarias en los ecosistemas terrestres y acuáticos, que son las que acumulan en sus cuerpos sustancias químicas ambientales en altas concentraciones (Baos *et al.*, 2006; Becker, 2003). La cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) es una especie omnívora y oportunista, situada en la parte superior de la cadena alimentaria (Baos *et al.*, 2006) y tiene una amplia gama de hábitats, incluyendo tanto los naturales como los urbanos y contaminados, como fundiciones y vertederos. La población de *Ciconia ciconia* está aumentando (BirdLife International, 2017), y en los países del sur de Europa muchas de estas aves ahora no migran y residen todo el año, ya que disponen de recursos alimenticios permanentes como son, por ejemplo, los vertederos o centros de tratamiento de residuos sólidos urbanos (CTRSU). Si bien en los últimos años esta ave silvestre se ha utilizado con éxito para la biomonitorización de metales, incluido el Pb (Baos *et al.*, 2006; Benito *et al.*, 1999; de la Casa-Resino *et al.*, 2014, 2015; Kamiński *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2017; Meharg *et al.*, 2002; Pérez-López *et al.*, 2016), ninguno de estos estudios ha analizado la actividad de Δ -ALAD, lo que tampoco ha ocurrido en otras especies de Ciconiiformes.

La actividad de la Δ -ALAD en sangre suele presentar una relación negativa con los niveles de Pb en sangre y por ello se ha utilizado como biomarcador de efecto y exposición a este metal en humanos y otros mamíferos (Peixoto *et al.*, 2003; Rodríguez-Estival *et al.*, 2012; van Bommel *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010), así como en varias especies de aves silvestres (Baos *et al.*, 2006; Binkowski y Sawicka-Kapusta, 2015; Espín *et al.*, 2015; Gómez-Ramírez *et al.*, 2011; Henny *et al.*, 2000; Holladay *et al.*, 2012; Martínez-Haro *et al.*, 2011; Scheuhammer, 1987; Strom *et al.*, 2002; Vanparys *et al.*, 2008). En aves se han registrado diferencias interespecíficas en la sensibilidad de la actividad de Δ -ALAD a las concentraciones de Pb en sangre (Pattee y Pain, 2003), lo que hace importante el estudio de esta enzima dentro de cada especie.

Los objetivos del presente trabajo fueron: (1) determinar y reportar la actividad sanguínea de Δ -ALAD en cigüeña blanca (tanto aves jóvenes como adultas); (2) estudiar la relación entre la concentración de Pb en sangre y la actividad de Δ -ALAD, el Hct y la Hb, y (3)



intentar definir aquella concentración de Pb en sangre que cause una inhibición significativa de Δ -ALAD y que por lo tanto sirva de umbral que se asocie con un efecto tóxico en esta especie.

II.2. MATERIAL Y MÉTODOS

II.2.1 Diseño del estudio y áreas de muestreo

El estudio se ha realizado en cigüeñas blancas de distintas edades y localizaciones. En el caso concreto de los animales procedentes del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre y Educación ambiental “Los Hornos”, situado en Sierra de Fuentes (Cáceres) y perteneciente a la Junta de Extremadura, las características de los animales y de la toma de muestras de sangre están recogidas en el Capítulo 1 de esta tesis. Para este estudio en particular, las muestras de sangre se recolectaron entre 2006 y 2008 de juveniles con más de 6 semanas a un año de edad ($n = 10$) y adultos ($n = 22$) con más de dos años (pico rojo brillante y patas rojas). De 2009 a 2011 se recolectaron muestras de pollos de cigüeña blanca ($n=95$), en tres colonias silvestres diferentes ubicadas en la provincia de Cáceres. La distribución anual de las muestras aparece en la **Tabla 20**. Todos los nidos de las tres colonias silvestres se encontraron en la copa de encinas (*Quercus ilex*) y fueron seleccionados por su accesibilidad (**Figura 6**). La primera (colonia Z) fue en una pradera ganadera con *Quercus ilex*, en un espacio natural alejado de fuentes aparentes de contaminación, considerado Zona de Especial Protección para las Aves según la Directiva Europea 2009/147/CE y formando parte integrante de la Red ecológica NATURA 2000, y conocida como " Los Llanos de Cáceres y Sierra de Fuentes " ($39^{\circ} 27' 47.47''$ N, $6^{\circ} 10' 24.44''$ W). Las otras dos colonias estaban ubicadas cerca de vertederos (CTRSU) que recibían desechos urbanos de las ciudades y pueblos cercanos. Uno de ellos (colonia AG) en una zona de pastizales, también con encinas, de uso ganadero y junto a una importante zona agrícola intensiva (gran cultivo de tabaco, pimiento, tomate, espárragos y maíz) atravesada por el río Tiétar; entre las localidades de Navalmoral de la Mata (17401 habitantes, 2012) y Talayuela (9269 habitantes, 2012) ($39^{\circ} 57' 6.04''$ N, $5^{\circ} 36' 55.61''$ W). La colonia C se encontraba en una zona de pastizales similar a la colonia Z, pero con más *Q. ilex* ($39^{\circ} 22' 3.77''$ N, $6^{\circ} 27' 18.99''$ W), a una distancia de unos 14 km de la ciudad de Cáceres (95668 habitantes, 2012) y una carretera importante (carretera nacional) que se encontraba a solo 15 m del nido más cercano en esta colonia. Estas tres colonias fueron objeto de estudio previo y habían mostrado diferentes patrones de contaminación por Pb (de la Casa-Resino *et al.*, 2014).

II.2.2. Muestreo de sangre

Todos los procedimientos se realizaron con cuidado para minimizar el estrés de las aves. Las muestras de sangre se tomaron únicamente de los ejemplares de cigüeña blanca que tras un examen físico veterinario se encontró que aparentemente no presentaban signos patológicos de ningún tipo y tenían una adecuada condición corporal.

Todos los procedimientos se realizaron con cuidado para minimizar el estrés de las aves. Las muestras de sangre se tomaron únicamente de los ejemplares de cigüeña blanca que tras un examen físico veterinario se encontró que aparentemente no presentaban signos



patológicos de ningún tipo y tenían una adecuada condición corporal.

En las colonias, tras la localización e identificación de cada nido, el acceso a los mismos se hizo mediante escalera hasta la copa de los árboles, desde donde se bajaron los pollos al suelo. Tras la toma de varios datos (peso con precisión de $\pm 1g$, condición corporal, edad estimada) y medidas morfométricas (longitud, anchura y altura del pico; longitud y anchura de la cabeza; longitud del tarso-metatarso; longitud del ala) se les extrajo sangre de la vena metatarsiana en la forma indicada en el Capítulo I de esta tesis. Los pollos fueron devueltos al nido tras su identificación con anillas de plástico oficiales. Cada muestra de sangre fue transferida a crioviales de plástico y se rellenó un tubo capilar de microhematocrito. Se mantuvieron en refrigeración en nevera hasta su llegada al laboratorio donde los crioviales se almacenaron a $-80^{\circ}C$ hasta la determinación de Pb, Δ -ALAD y Hb, y los tubos capilares se procesaron para calcular el hematocrito.

La recolección de muestras fue aprobada por la Comisión de Bioética de la Universidad de Extremadura y contó con los permisos correspondientes por parte de la autoridad regional, la Dirección General del Medio Natural de la Junta de Extremadura.

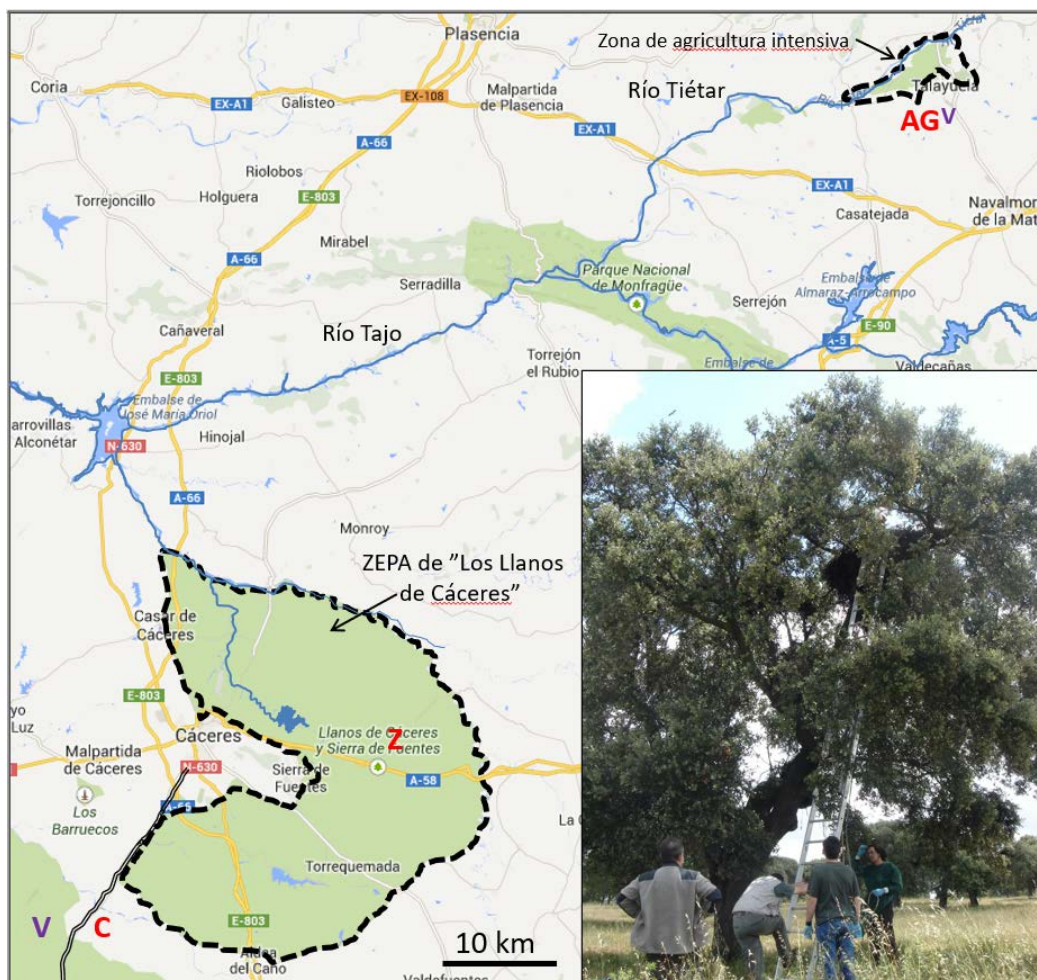


Figura 6. Mapa de distribución de las colonias de cigüeña blanca (C, AG y Z) donde se tomaron las muestras de sangre de pollos (V=vertedero) e imagen de una de las tomas.



Tabla 20. Distribución del número de muestras de sangre por año, lugar de muestreo y grupo de edad.

	C. R. Los Hornos		Colonia Z	Colonia AG	Colonia C
Año	adultos	juveniles	pollos	pollos	pollos
2006		5			
2007	12	5			
2008	10				
2009			10	9	8
2010			6	13	
2011			23	7	19
Total	22	10	39	29	27

II.2.3. Reactivos

Se utilizó agua Milli-Q para preparar soluciones y diluciones. Los disolventes y reactivos utilizados eran de grado analítico o de alta pureza y se adquirieron de SPINREACT®, Sigma-Aldrich, Panreac (Moncada i Reixac, España) y Merck (Darmstad, Alemania).

II.2.4. Determinación de concentraciones de Pb en sangre

El análisis de Pb en sangre se desarrolló en el Laboratorio de Análisis Elemental y Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAIUEX, acreditado por ISO 9001: 2008), de la Universidad de Extremadura siguiendo el protocolo y condiciones que han sido detalladas en el Capítulo 1 de esta tesis. Junto a cada lote de sangre se analizó también una muestra de referencia certificada de sangre completa (Seronorm® Trace Elements Whole Blood) como control de calidad del análisis. Los valores obtenidos para Pb fueron consistentes con los valores de referencia certificados, y su límite de detección (LD) fue de 0,21 µg/L.

II.2.5. Determinación de la actividad Δ-ALAD

La actividad de la enzima Δ-ALAD se determinó colorimétricamente en sangre completa según el método descrito por Scheuhammer (1987). Para cada muestra se preparó su correspondiente blanco, y todos los análisis se hicieron por duplicado, por lo que se necesitaron 4 tubos Eppendorf® de 1,5 mL por muestra. Las muestras de sangre se descongelaron y mantuvieron en agua helada. A cada tubo se añadieron 80 µL del agente hemolizante Triton X-100 y 20 µL de cada muestra (20 µL de agua en los blancos). Luego se añadieron secuencialmente: 100 µL de ácido morfolin-etano-sulfónico (MES) 0,5 M a pH 6,6; 50 µL de agua desionizada y 50 µL de ácido aminolevulínico (ALA) 60 mM. En los tubos blanco se añadieron inmediatamente 200 µL de ácido tricloroacético 60 mM (TCA Hg²⁺) para evitar la acción enzimática. Todos los tubos se mezclaron en un vórtex y se incubaron en un baño de agua a 41°C durante 1 hora, tras lo cual se volvieron a agitar y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min (Selecta® Centronic S577). De cada sobrenadante se añadieron 400 µL a sendos tubos conteniendo 750 µL de reactivo de Ehrlich modificado. El producto de color, obtenido tras 10 minutos se midió con un espectrofotómetro (Hitachi® UV-1603) a 555 nm frente al blanco correspondiente. El



fundamento de este método consiste en la medida cuantitativa del color rojizo del producto producido por la acción de la enzima sobre el sustrato ALA, el porfobilinógeno o PBG, tras reacción con el DMAB del reactivo de Ehrlich modificado. La actividad enzimática se calculó en función del litro de glóbulos rojos (L GR) aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{mol PBG/h/L GR} = \frac{\text{factor de dilución} * \text{Abs}_{555} * 100}{\text{absortividad del PBG} * \text{Hct} (\%)}$$

II.2.6. Cálculo de hematocrito y de la concentración de Hb.

El valor Hct de cada muestra de sangre se determinó tras la centrifugación del tubo capilar de microhematocrito en centrífuga específica a 12000 rpm durante 5 minutos.

La concentración de Hb se determinó colorimétricamente a 540 nm usando un kit comercial basado en el método de Drabkin (Hemoglobin, SPINREACT®).

II.2.7. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 6.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California EE.UU.) (www.graphpad.com). El nivel de significancia para todas las pruebas se estableció en $p < 0.05$. Las concentraciones de Pb en sangre, la actividad de Δ -ALAD, Hct y Hb se tabularon y se representaron mediante la mediana, media \pm desviación estándar (DE) y rango. Para estudiar el comportamiento de la actividad de Δ -ALAD en relación a las concentraciones de Pb utilizamos el global de datos estableciendo cuatro grupos de rangos de concentración de Pb en sangre: Pb-1 ($< 50 \mu\text{g/L}$), Pb-2 (> 50 a $< 100 \mu\text{g/L}$), Pb-3 (> 100 a $< 200 \mu\text{g/L}$), y Pb-4 ($\geq 200 \mu\text{g/L}$), de acuerdo a los distintos umbrales de efecto del Pb indicados en la bibliografía (Pattee y Pain, 2003, Franson y Pain, 2011, Espín *et al.*, 2015). Los datos de cada parámetro se agruparon en cuatro grupos: tres en función de la edad (adultos, juveniles y pollos) y un cuarto con el global de los datos (todos los ejemplares). Tras aplicar los test de normalidad de D'Agostino y Pearson, y Shapiro-Wilk se comprobó que gran parte de las variables no se ajustaron a la distribución normal por lo que para la comparación estadística entre grupos se utilizaron pruebas no paramétricas (la prueba de Kruskal-Wallis para más de dos grupos seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn para diferenciar entre pares de grupos). Para el estudio de correlaciones entre los distintos parámetros se utilizó la prueba no paramétrica de correlaciones de Spearman. Además, los valores de Pb en sangre se transformaron logarítmicamente, como es habitual en la bibliografía, para realizar un estudio de regresión lineal con los demás parámetros y así conseguir representaciones gráficas lineales. Para establecer la actividad de Δ -ALAD como inhibida se aplicó el criterio de Henny *et al.* (2000), que definen que la actividad enzimática puede considerarse significativamente inhibida cuando su valor es inferior a la actividad media de un grupo de referencia menos 2 x DE (desviación estándar) del mismo grupo de referencia. El grupo con concentraciones de Pb en sangre por debajo de $50 \mu\text{g/L}$ se consideró el grupo de referencia para calcular la inhibición significativa de Δ -ALAD.



II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. Valores de los distintos parámetros

En la **Tabla 21** se relacionan los datos descriptivos de los distintos parámetros analizados, y en la **Tabla 22** los resultados del estudio comparativo entre los grupos de edad.

Los niveles sanguíneos globales de Pb mostraron un rango bastante amplio, ya que oscilaron entre 5,52 µg/L y 780,5 µg/L, encontrándose el valor más alto en un ejemplar del grupo de pollos. El nivel medio de Pb fue mayor en el grupo de juveniles, diferenciándose significativamente de los grupos de adultos y de pollos, mostrando estos dos últimos grupos unos valores medios bastante similares.

Tabla 21. Descriptivos de los parámetros sanguíneos en cigüeña blanca de forma global (total de ejemplares) y en función del grupo de edad. $X \pm DE$ = Media \pm Desviación estándar.

		Plomo (µg/L)	Δ-ALAD (µmol PBG/h/L GR)	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/L)
GLOBAL	<i>X ± DE</i>	77,35 ± 98,07	1296 ± 695	36,93 ± 5,48	127,8 ± 19,82
	<i>Mediana</i>	54,4	1374	36,23	127,6
	<i>Rango</i>	5,52-780,5	32,04-2972	23,4-53,62	90,43-173,2
	<i>Nº aves</i>	127	127	127	99
ADULTOS	<i>X ± DE</i>	68,15 ± 45,27	737,8 ± 496,7	42,56 ± 6,66	137,9 ± 22,79
	<i>Mediana</i>	66,95	607,5	44,2	138,2
	<i>Rango</i>	9,4-166,5	111,4-1711	31,25-53,2	97,96-167,7
	<i>Nº aves</i>	22	22	22	9
JUVENILES	<i>X ± DE</i>	182,4 ± 118,3	351,4±279,1	43,01 ± 3,605	146,3±25,42
	<i>Mediana</i>	166,6	273,6	42,85	145,0
	<i>Rango</i>	23,20 – 383,0	68,88-844,6	35,38-47,62	107,6-173,2
	<i>Nº aves</i>	10	10	10	6
POLLOS	<i>X ± DE</i>	68,42±99,09	1524±603,8	34,99 ± 3,73	125,4±18,26
	<i>Mediana</i>	49,10	1545	35,00	123,6
	<i>Rango</i>	5,52 – 780,5	32,04-2972	23,40 - 42,62	90,43-171,3
	<i>Nº aves</i>	95	95	95	84

**Tabla 22.** Estudio estadístico multivariante sobre el efecto de la edad en la actividad de las enzimas plasmáticas.

	Kruskal-Wallis test (valor de p)	Test de comparación múltiple de Dunn		
		Adultos- Juveniles	Adultos- Pollos	Juveniles- Pollos
Plomo	14,27 (***)	*	ns	***
Δ-ALAD	40,89 (***)	ns	***	***
Hematocrito	35,63 (***)	ns	***	***
Hemoglobina	6,581 (*)	ns	ns	ns

(ns-no significativo; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

El 45,7% de las muestras tenía Pb en sangre por debajo de 50 $\mu\text{g/L}$ y solo un pequeño porcentaje (7,1%) tenían valores por encima de 200 $\mu\text{g/L}$, habiéndose indicado que valores de Pb inferiores a 150 $\mu\text{g/L}$ son suficientes para causar inhibición de la Δ -ALAD en sangre de rapaces silvestres (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011; Martínez-López *et al.*, 2004). En una revisión bibliográfica, Buekers *et al.* (2009) indican que los niveles de fondo de Pb en sangre de aves son muy variables, dependiendo de la especie y la publicación, ya que se han reportado concentraciones de Pb en sangre que variaban desde 10 $\mu\text{g/L}$ en ánades reales juveniles (*Anas platyrhynchos*) a 700 $\mu\text{g/L}$ en ánades reales adultos. La mayoría de las muestras del presente estudio tenían, por tanto, unas concentraciones de Pb en sangre consideradas de fondo (<50 $\mu\text{g/L}$) en cigüeña blanca de áreas consideradas con baja contaminación metálica (de la Casa-Resino *et al.*, 2014; Kamiński *et al.*, 2008; Pérez-López *et al.*, 2016).

La actividad de Δ -ALAD mostró una alta oscilación, con un rango entre 32,04 y 2972 $\mu\text{mol PBG/h/L GR}$ (Tabla 21). Esta actividad enzimática mostró diferencias altamente significativas entre grupos, siendo los niveles medios sensiblemente más altos en los pollos que en los otros dos grupos (juveniles y adultos), si bien entre estos dos últimos grupos no hubo diferencias (Tabla 22).

Los parámetros hematológicos estudiados (Tabla 21) exhibieron valores similares a los descritos por otros autores para polluelos de cigüeña blanca (Alonso *et al.*, 1991). Los valores medios de Hb y el Hct siguieron el mismo patrón: juveniles > adultos > pollos, si bien en la Hb no existieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. En el Hct los valores en los pollos fueron significativamente menores a los observados en juveniles y adultos. Se sabe que los parámetros hematológicos están influenciados por muchos factores fisiológicos, como la edad, el sexo, el estadio hormonal (Pain, 1989). El factor edad en este caso puede influir en las diferencias observadas, ya que las cigüeñas blancas adultas suelen tener valores medios más altos de Hct y Hb (Alonso *et al.*, 1991).



II.3.2 Relaciones entre los distintos parámetros estudiados

En la **Tabla 23** y **Figura 7** se presentan los resultados del estudio de correlación (test de Spearman) entre los distintos parámetros, tanto de forma global como diferenciado por edades. La mayor inhibición enzimática de Δ -ALAD (32,04 $\mu\text{mol PBG/h/l}$ de GR) se observó en la muestra con el nivel máximo de Pb (780,5 $\mu\text{g/L}$). El nivel máximo de actividad (2972 $\mu\text{mol PBG/h/L GR}$) se observó en una muestra con 7,04 $\mu\text{g/L}$ de Pb (la segunda en menor concentración de Pb). Comprender la relación entre las concentraciones de Pb en sangre y la inhibición de la actividad enzimática es más útil que evaluar los valores absolutos de Δ -ALAD (Binkowski y Sawicka-Kapusta, 2015). Según Martínez-López *et al.* (2004) para una interpretación correcta de la actividad de Δ -ALAD, es útil comparar los resultados con los valores de actividad de Δ -ALAD de animales expuestos a niveles bajos de Pb.

El estudio de correlación de Spearman entre los datos globales de Pb y Δ -ALAD demostraron la existencia de una correlación negativa altamente significativa (r de Spearman = -0,8052, $p < 0,001$), que además se encontró en los tres grupos de edad: adultos (r de Spearman = -0,8351, $p < 0,001$), juveniles (r de Spearman = -0,6727, $p < 0,01$) y pollos (r de Spearman = -0,8326, $p < 0,001$).

Además, se estudió la relación entre la actividad Δ -ALAD y el Pb estableciendo cuatro grupos de rangos de concentración utilizando el global de datos: Pb-1 (<50 $\mu\text{g/L}$), Pb-2 (>50 a <100 $\mu\text{g/L}$), Pb-3 (>100 a <200 $\mu\text{g/L}$), y Pb-4 (≥ 200 $\mu\text{g/L}$). Estos cuatro rangos diferentes se seleccionaron de acuerdo con las referencias bibliográficas. Para concentraciones de Pb en sangre por debajo de 50 $\mu\text{g/L}$ se ha registrado inhibición de Δ -ALAD en algunas especies de aves (Pattee y Pain, 2003) y se han indicado los siguientes umbrales en los que el Pb tiene efectos sobre la enzima Δ -ALAD: 50 $\mu\text{g/L}$ en búho real y 80 $\mu\text{g/L}$ en buitre leonado, necesitando el buitre concentraciones más altas de Pb que el búho real para producir el mismo grado de inhibición (Espin *et al.*, 2015). Aunque, en general, se ha indicado que concentraciones de Pb en sangre sobre 200 $\mu\text{g/L}$ inhiben la Δ -ALAD un 50%, existen diferencias interespecíficas en la sensibilidad de la enzima al Pb (Berglund *et al.*, 2010). Vanparys *et al.* (2008) observaron que en el carbonero común (*Parus major*) una concentración de Pb de 30 $\mu\text{g/L}$ producía un 25 % de inhibición, mientras que 220 $\mu\text{g/L}$ produjo una inhibición del 50%. Parece que la actividad de Δ -ALAD se correlaciona mejor con concentraciones de Pb en sangre superiores a 100-150 $\mu\text{g/L}$ y los valores superiores a 200 $\mu\text{g/L}$ se describen en las anseriformes como valores tóxicos (Franson y Pain, 2011).

En la **Tabla 24** se relacionan los datos descriptivos de los distintos parámetros para cada grupo de rango de Pb, y en la **Tabla 25** los resultados del estudio comparativo entre los grupos de rangos de Pb. Estos resultados se presentan gráficamente en la **Figura 7**.

Se encontró que las medianas de la actividad de la enzima Δ -ALAD eran significativamente diferentes entre los 4 grupos de concentraciones de Pb en sangre ($p < 0,001$).

El grupo de aves con concentraciones de Pb por debajo de 50 $\mu\text{g/L}$ tuvo una actividad



enzimática media significativamente más alta que los otros 3 grupos, ($p < 0,001$), aunque esta actividad Δ -ALAD no difirió estadísticamente entre los grupos de mayor rango de Pb (Pb-3 y Pb-4). Como se mencionó anteriormente, alrededor del 46% de las muestras en el presente estudio tenían concentraciones de Pb en sangre relativamente bajas ($< 50 \mu\text{g/L}$); y Pain (1989) indicó que los valores de Pb por debajo de este límite aún pueden influir en la actividad Δ -ALAD del pato negro (*Anas rubripes*) y Espín *et al.* (2015) lo consideran como el umbral para inhibir la actividad enzimática en el búho real.

Aunque las aves tienen una actividad basal normal de Δ -ALAD superior a la de los mamíferos, en la mayoría de los aspectos su comportamiento es similar al de la Δ -ALAD de estos (Scheuhammer, 1987). En humanos, la actividad Δ -ALAD posiblemente no tiene una relación lineal con niveles bajos a moderados de Pb sanguíneo e incluso se incrementa con el aumento de Pb (Wang *et al.*, 2010). También en el ser humano, Campagna *et al.* (1999) propusieron un umbral de 32 a 48 $\mu\text{g/L}$ por debajo del cual la Δ -ALAD puede ser insensible o incluso activada por el Pb, y por encima del cual puede inhibirse. El polimorfismo genético en la enzima Δ -ALAD humana se ha asociado con una afinidad enzimática diferente para la unión del Pb (Holladay *et al.*, 2012; van Bommel *et al.*, 2011). Ello puede contribuir a una actividad enzimática diferente con concentraciones de Pb dentro del mismo rango y podría explicar algunos de los resultados observados en este estudio. Sin embargo, no se encontró información en la literatura sobre el polimorfismo genético en la enzima Δ -ALAD de las cigüeñas blancas, lo que debería investigarse más a fondo.



Tabla 23. Resultados del estudio estadístico de correlaciones (r de Spearman y significación estadística) entre cada parámetro sanguíneo en función de la edad y del global de los ejemplares de cigüeña blanca. Se detallan las correlaciones significativas mediante colores (verde= $p < 0,05$; azul= $p < 0,01$ y rojo= $p < 0,001$).

		Pb	Hb	Hct	Pb	Pb	ALAD	ALAD	ALAD	Hct	Hct	Hct	
		Global	Global	Global	Adulto	Joven	Pollo	Adulto	Joven	Pollo	Adulto	Joven	Pollo
ALAD	Global	-0,8052	0,0110	-0,4623									
Hct	Global	0,3051	-0,0390										
Hb	Global	-0,0621											
ALAD	Adulto			-0,8351									
ALAD	Joven			-0,6727									
ALAD	Pollo						-0,8326						
Hct	Adulto				-0,1390		-0,1299						
Hct	Joven					-0,1636		0,1515					
Hct	Pollo									-0,2699			
Hb	Adulto				-0,6333		0,4333			-0,0921			
Hb	Joven					-0,5429		0,6000				-0,1429	
Hb	Pollo									-0,0589			0,6291

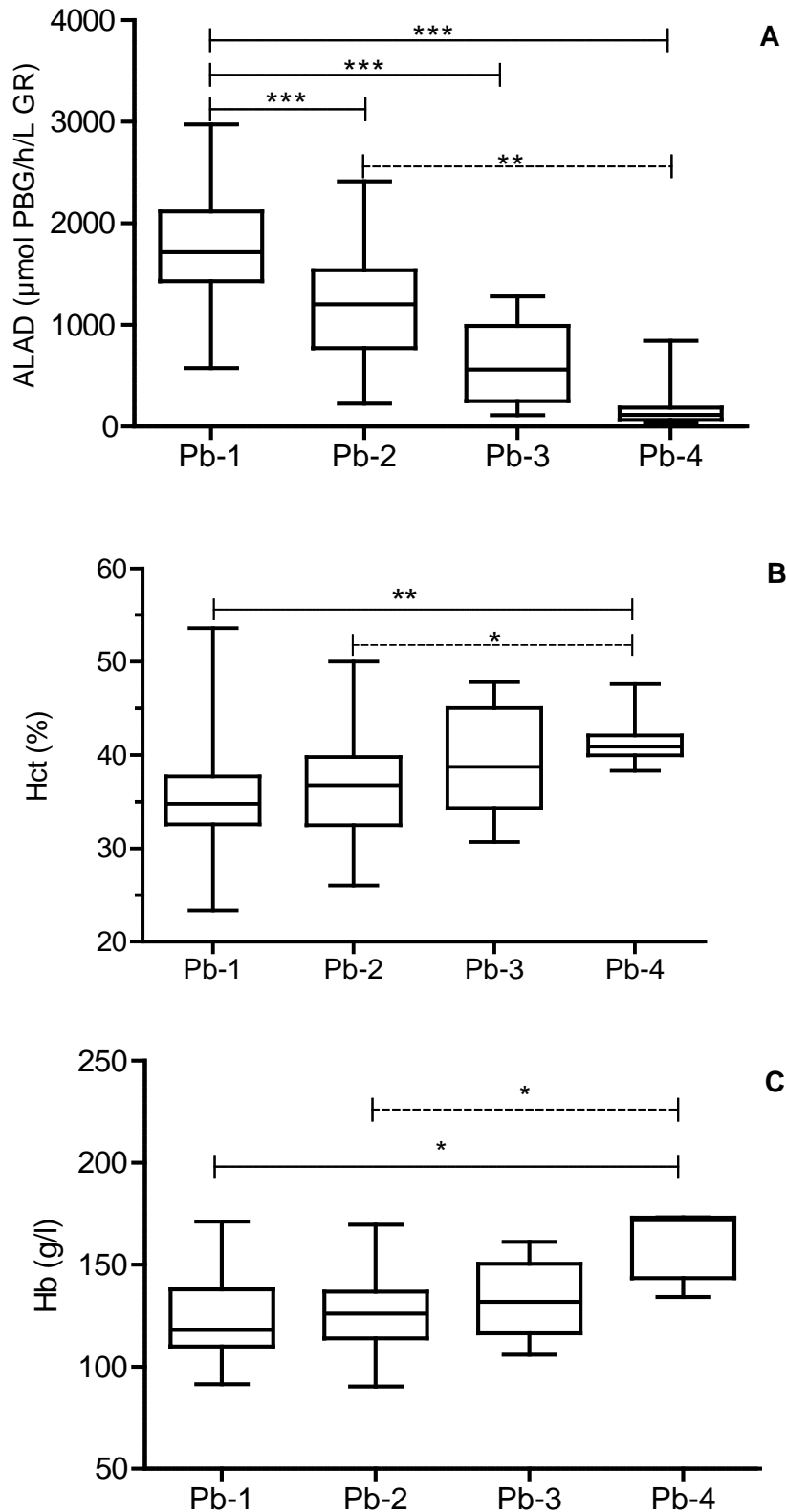


Figura 7. Niveles de Δ -ALAD (A), hematocrito (B) y hemoglobina (C) en los cuatro grupos de rangos de niveles de plomo: Pb-1 (<50 $\mu\text{g/L}$), Pb-2 (>50 a <100 $\mu\text{g/L}$), Pb-3 (>100 a <200 $\mu\text{g/L}$) y Pb-4 (≥ 200 $\mu\text{g/L}$). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Tabla 24. Estadísticos descriptivos de los parámetros sanguíneos Δ -ALAD, hematocrito y hemoglobina en cigüeña blanca en función de los cuatro grupos de niveles de plomo en sangre. $X \pm DE$ = Media \pm Desviación típica.

Grupo		Plomo ($\mu\text{g/L}$)	Δ -ALAD (μmol PBG/h/L GR)	Hct (%)	Hb (g/l)
Pb-1 ($<50 \mu\text{g/L}$)	$X \pm DE$	26,04 \pm 12,89	1768 \pm 511,3	35,56 \pm 5,12	123,5 \pm 18,06
	Mediana	22,95	1714	34,82	118,0
	Rango	5,52-49,10	575,4-2972	23,40-53,62	91,42-171,3
	Nº aves	58	58	58	44
Pb-2 (>50 a $<100 \mu\text{g/L}$)	$X \pm DE$	71,02 \pm 13,97	1138 \pm 508,7	37,01 \pm 5,68	126,8 \pm 18,69
	Mediana	72,00	1206	36,80	126,1
	Rango	50,10-98,80	225,9-2414	26,00-50,00	90,43-169,7
	Nº aves	46	46	46	38
Pb-3 (>100 a $<200 \mu\text{g/L}$)	$X \pm DE$	127,6 \pm 27,44	618,8 \pm 390,0	39,48 \pm 5,60	134,8 \pm 18,48
	Mediana	121,4	562,6	38,76	131,9
	Rango	100,1-179,9	111,4-1283	30,70-47,83	105,9-161,3
	Nº aves	14	14	14	13
Pb-4 ($>200 \mu\text{g/L}$)	$X \pm DE$	362,3 \pm 181,4	191,5 \pm 251,0	41,37 \pm 2,63	162,8 \pm 19,06
	Mediana	318,9	116,4	40,90	171,9
	Rango	205,2-780,5	32,04-844,6	38,33-47,62	134,3-173,2
	Nº aves	9	9	9	4

Tabla 25. Estudio estadístico multivariante entre los parámetros sanguíneos plomo, Δ -ALAD, hematocrito y hemoglobina en cigüeña blanca en función de los cuatro grupos de niveles de plomo en sangre (ns: no significativa; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$).

	Kruskal- Wallis test (valor p)	Test de comparación múltiple de Dunn					
		Pb1- Pb2	Pb1- Pb3	Pb1- Pb4	Pb2- Pb3	Pb2- Pb4	Pb3- Pb4
Plomo	110 (***)	***	***	***	*	*	Ns
Δ-ALAD	66 (***)	***	***	***	ns	**	Ns
Hematocrito	16,87 (***)	ns	ns	**	ns	*	Ns
Hemoglobina	10,87 (*)	ns	ns	*	ns	*	Ns



Para comprobar si la Δ -ALAD estaba inhibida significativamente en su funcionalidad se aplicó el criterio de Henny *et al.* (2000), de restar el valor de 2 desviaciones estándar del valor medio del grupo con Pb <50 $\mu\text{g/L}$, lo que reveló que para valores de actividad Δ -ALAD <275,1 $\mu\text{mol PBG/h/L GR}$, la enzima podría considerarse con una inhibición significativa. En los grupos de Pb >100 a >200 $\mu\text{g/L}$ y Pb >200 $\mu\text{g/L}$, la media y mediana del valor de actividad de Δ -ALAD fue inferior a estos valores (**Figura 8**). Como se describe en la normativa estadounidense sobre Evaluación de Daños a Recursos Naturales (Regulación Federal 43CFR11.62), citado por Holladay *et al.* (2012) y Vanparys *et al.* (2008), el 50% de inhibición de Δ -ALAD puede considerarse el nivel a partir del cual se produce un daño biológico en la categoría “mal funcionamiento físico” en aves y mamíferos. Con este criterio, los 2 grupos con Pb \geq 100 $\mu\text{g/L}$ tenían una actividad enzimática media inhibida mayor del 50% en comparación con el grupo de referencia (Pb <50 $\mu\text{g/L}$) y podrían estar sufriendo este “mal funcionamiento físico”.

Para establecer un modelo de aproximación al umbral de inhibición de la Δ -ALAD por el Pb en la cigüeña blanca, dada la relación lineal en el conjunto de datos, se hizo un estudio de regresión lineal, tanto con los datos de Pb en $\mu\text{g/L}$ como en log-Pb, en los siguientes grupos de datos: <50 $\mu\text{g/L}$ (n=58), <40 $\mu\text{g/L}$ (n=44), <30 $\mu\text{g/L}$ (n=39), <25 $\mu\text{g/L}$ (n=34), <20 $\mu\text{g/L}$ (n=24) y <15 $\mu\text{g/L}$ (n=13). Todos estos grupos pasaron los test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, D’Ágostino y Pearso, y Shapiro-Wilk. Como se observa en la siguiente **Tabla 26** el cambio en la significación de la regresión lineal se produjo entre los grupos <25 $\mu\text{g/L}$ y <20 $\mu\text{g/L}$, por lo que se puede tomar el grupo <20 $\mu\text{g/L}$ como de referencia para no exposición al Pb.

Tabla 26. Estudio de regresión lineal entre la concentración de plomo y la actividad Δ -ALAD en distintos grupos de rangos de concentración de plomo expresado tanto en su dato normal ($\mu\text{g/L}$) como en su valor transformado logarítmicamente (log-Pb).

Pb	Media \pm DE	Regresión lineal Pb- Δ -ALAD		Regresión lineal log-Pb- Δ -ALAD	
		r ²	F (p)	r ²	p
<50 $\mu\text{g/L}$	1772 \pm 513,5	0,2793	21,71 (***)	0,3023	24,27 (***)
<40 $\mu\text{g/L}$	1860 \pm 518,9	0,3028	18,71 (***)	0,2843	16,69 (***)
<30 $\mu\text{g/L}$	1929 \pm 497,1	0,1914	8,76 (**)	0,1823	8,247 (**)
<25 $\mu\text{g/L}$	1961 \pm 512,4	0,1869	7,35 (*)	0,1654	6,341 (*)
<20 $\mu\text{g/L}$	2095 \pm 472,3	0,0416	0,954 (ns)	0,0467	1,078 (ns)
<15 $\mu\text{g/L}$	2135 \pm 571,6	0,0837	1,004 (ns)	0,0693	0,8190 (ns)

(ns-no significativo; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

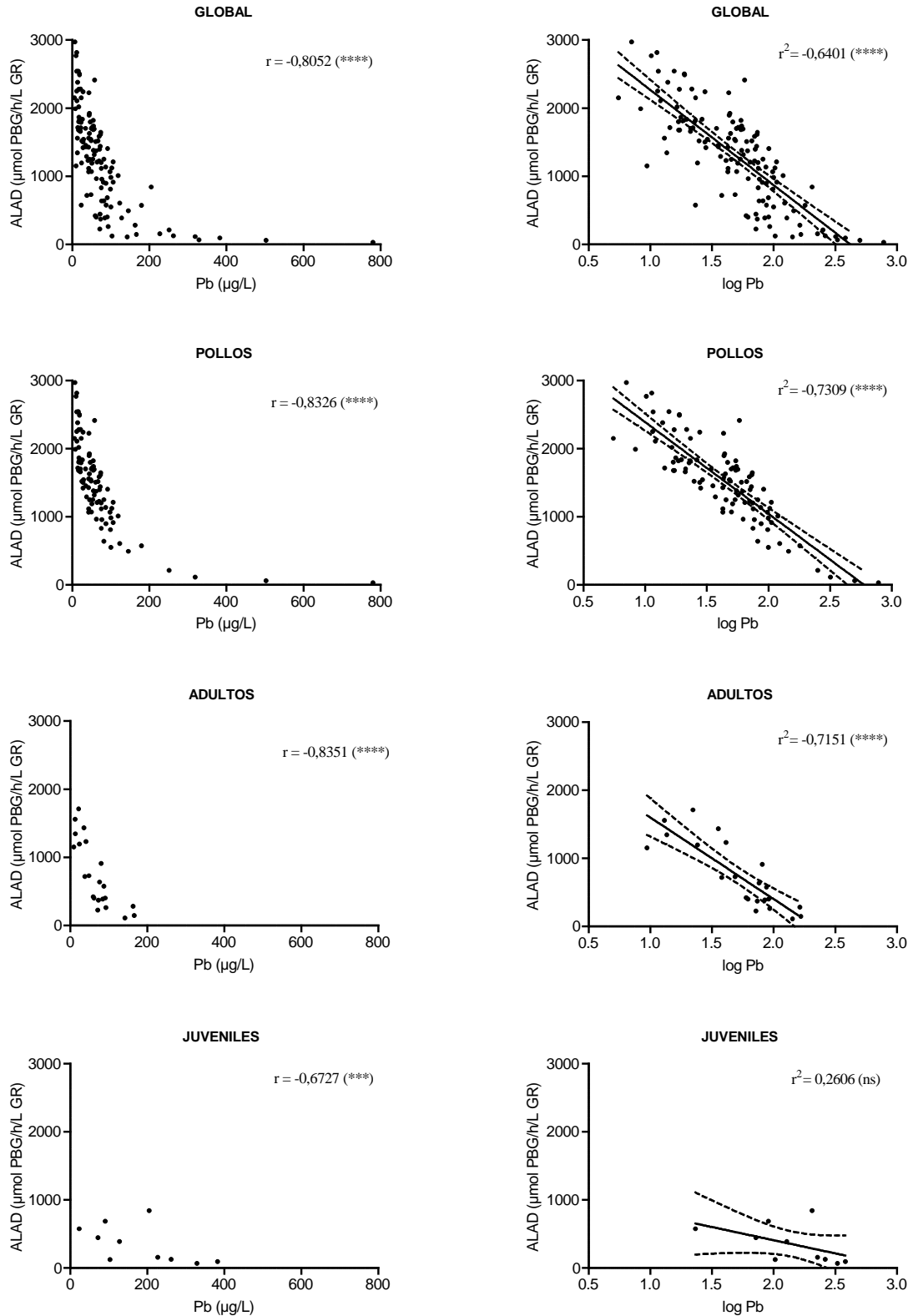


Figura 8. Correlaciones entre la actividad Δ -ALAD y el Pb en sangre de forma global (todos los datos) y en función de la edad con indicación de la correlación de Spearman (Izquierda) y de la regresión lineal con el log-Pb (derecha).



Teniendo en cuenta los datos anteriores y la ausencia de significación estadística entre el grupo de <20 y <15 $\mu\text{g/L}$, también se establecieron los siguientes grupos de rangos de concentración de Pb: <50 a >40 $\mu\text{g/L}$ (n=14), >30 a <40 $\mu\text{g/L}$ (n=5), >20 a <30 $\mu\text{g/L}$ (n=15) y <20 $\mu\text{g/L}$ (n=24). Entre estos grupos se realizó un ANOVA, seguido del test de comparación múltiple de Tukey, para comprobar la existencia de diferencia significativas entre los grupos en función de la concentración de Pb, y también entre la actividad Δ -ALAD. Los resultados se muestran en la **Tabla 27**, y el ANOVA resultó altamente significativo entre grupos ($p < 0,0001$) tanto en función de la concentración de Pb como de la actividad Δ -ALAD. Las diferencias significativas existieron entre todos los grupos de concentración de Pb, en para la actividad enzimática las diferencias estadísticamente significativas existieron entre los dos grupos con más de 30 $\mu\text{g/L}$ y el grupo con menos de 20 $\mu\text{g/L}$. Estos resultados refuerzan el resultado del estudio anterior, de que el grupo con una concentración de Pb <20 $\mu\text{g/L}$ se puede considerar como de referencia para una ausencia de efecto significativo para la actividad Δ -ALAD. Por ello, en base a estos resultados, consideramos que la concentración a partir de la cual se puede establecer el umbral de inhibición de la enzima por el Pb es de 30 $\mu\text{g/L}$, inferior al generalmente establecido para las aves (50 $\mu\text{g/L}$) o a los indicados para búho real y buitre leonado (Espín et al., 2015).

Tabla 27. Estudio estadístico (ANOVA con test de Tukey) entre grupos de rangos de concentración de plomo en función de la concentración de plomo y la actividad Δ -ALAD. Se indica el porcentaje de inhibición de la enzima respecto al grupo de menor concentración de plomo.

Grupo	Pb ($\mu\text{g/L}$) Media \pm DE	ALAD Media \pm DE	Inhibición respecto a <20 $\mu\text{g/L}$ (%)
>40 a <50 $\mu\text{g/L}$ (n=14)	44,73 \pm 2,53 (a)*	1495 \pm 395,9 (b)	28,6
>30 a <40 $\mu\text{g/L}$ (n=5)	36,12 \pm 1,45 (a)	1320 \pm 367,8 (c)	36,96
>20 a <30 $\mu\text{g/L}$ (n=15)	28,39 \pm 6,15 (a)	1664 \pm 426,6	20,53
<20 $\mu\text{g/L}$ (n=24)	14,01 \pm 4,04 (a)	2094 \pm 472,3 (b, c)	

*: letras entre mismos grupos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre esos grupos.

Los valores de Pb en sangre se transformaron logarítmicamente, como es habitual en la bibliografía (Espín *et al.*, 2015; Gómez-Ramírez *et al.*, 2011; Martínez-Haro *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010) y así conseguir representaciones gráficas lineales para poder realizar un estudio de regresión lineal con los demás parámetros.

La correlación encontrada entre log-Pb y Δ -ALAD fue siempre negativa y estadísticamente significativa, tanto considerando los datos globales como los de los grupos de edad (**Tabla 28, Figura 8**). La actividad de Δ -ALAD y el log-Pb en sangre



tenían una correlación negativa más significativa cuando los niveles de Pb eran superiores a 200 $\mu\text{g/L}$ o inferiores a 50 $\mu\text{g/L}$. Así, en los 4 grupos diferentes de rangos de Pb en sangre, el grupo con mayores niveles de Pb ($\geq 200 \mu\text{g/L}$) tuvo una correlación negativa más significativa (r de Spearman = -0,97; $p < 0,001$) que los otros grupos, seguido por el grupo Pb-1 (r de Spearman = -0,67; $p < 0,001$). Los otros grupos de niveles de Pb intermedios mostraron correlaciones significativas algo inferiores: grupo Pb-2 (r de Spearman = -0,50; $p < 0,001$) y grupo P-3d (r de Spearman = -0,49; $p < 0,05$).

Para varias especies de aves se describe que la correlación negativa significativa entre la actividad de la enzima Δ -ALAD y Pb ocurre solo por encima de un umbral determinado de concentración de Pb en sangre (Lumeij, 1985).

Como ya se indicó, la Δ -ALAD se correlaciona más intensamente con los niveles de Pb en sangre cuando el nivel de este metal se encuentra entre 100-150 $\mu\text{g/L}$ (Franson y Pain, 2011). Se ha demostrado en modelos *in vitro* que otros metales como Cd, Cu y Hg pueden inhibir la actividad de la Δ -ALAD, pero con una potencia de hasta 100 veces menos que la inhibición causada por Pb (Scheuhammer, 1987). Debido a esto, el Pb se considera un inhibidor relativamente específico de la actividad Δ -ALAD (Pattee y Pain, 2003).

También se estudió la relación entre los niveles de Pb con los otros parámetros hematológicos (Hct y Hb).

Se observó un ligero incremento inesperado de Hct cuando aumentaron las concentraciones de Pb en sangre (**Tabla 24, Figura 7**), encontrándose diferencias significativas entre el grupo de Pb-4 ($> 200 \mu\text{g/L}$) y los dos grupos Pb-1 y Pb-2 con niveles menores de Pb. El estudio de correlación de Spearman entre los datos globales de Pb y Hct demostraron la existencia de una correlación positiva altamente significativa (r de Spearman = 0,3051, $p < 0,001$), que también se encontró en el grupo de los pollos, aunque de menor significación estadística (r de Spearman = 0,2065, $p < 0,01$) (**Tabla 23**). Cuando se utilizó el valor de Pb transformado logarítmicamente (\log -Pb) y se hizo el estudio de regresión lineal entre ambos parámetros nos encontramos con los mismos resultados estadísticos (**Tabla 28**). El hecho de que la correlación y regresión positiva significativas aparecieran en el conjunto total de las muestras y en el grupo de los pollos, y no así en los grupos de adultos y juveniles, se pudo deber al hecho de que el tamaño muestral en el grupo de pollos fue sensiblemente mayor ($n=95$ pares de datos) que en los otros grupos ($n=22$ pares de datos en el grupo de adultos y $n=10$ pares de datos en el grupo de los juveniles), contribuyendo el conjunto de los datos ($n=127$ pares de datos) a mejorar la significación estadística.

Un hecho paralelo ocurrió en el caso de la concentración de Hb, que siguió la misma tendencia que el Hct, incluso en lo que respecta a la significación estadística de las diferencias entre grupos de edad (**Tablas 21 y 22; Figura 7**). Sin embargo, la Hb no mostró correlación con el Pb con los datos globales, ni tampoco en los grupos de edad (**Tabla 23**). La única correlación significativa de la Hb apareció con el Hct en el grupo de los pollos, siendo una correlación positiva altamente significativa (r de Spearman = 0,6291, $p < 0,001$). Pain (1989) encontró una correlación negativa entre Pb y Hb) en el pato negro (*Anas rubripes*); sin embargo, el mismo autor refiere que en algunas especies



de aves cuando el Pb en sangre es inferior a 2000 $\mu\text{g/L}$, la Hb puede ser un pobre indicador de exposición al Pb. En nuestro estudio, el valor máximo de Pb fue claramente inferior a este valor.

Diferentes autores describen distintas conclusiones sobre cómo el Pb en sangre se relaciona con el Hct y la Hb en aves (Berglund *et al.*, 2010). Se ha indicado que la inhibición de la actividad de la enzima Δ -ALAD puede ocurrir sin una disminución correspondiente en la síntesis de hemo, Hct o Hb (Espin *et al.*, 2015; Lumeij, 1985; Pattee y Pain, 2003).

El efecto observado en nuestro estudio de incremento de Hct y Hb con el aumento en las concentraciones de Pb en sangre, puede explicarse por un mecanismo compensatorio para mejorar la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, como se describió previamente en aves acuáticas expuestas a niveles subclínicos de Pb (Martínez -Haro *et al.*, 2011) y en bovinos y ovinos de una zona minera (Rodríguez-Estival *et al.*, 2012).

Tabla 28. Resultados del estudio estadístico de regresión lineal (valores de r^2 y significación estadística) entre el Pb (valor logarítmico) y la Δ -ALAD en función de la edad y del global de los ejemplares de cigüeña blanca. Se detallan las correlaciones significativas (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$).

	Pb (Log) - Δ -ALAD	Pb (Log) - Hct	Pb (Log) - Hb
Global	-0,6401***	0,0572**	0,0261
Adultos	-0,7151***	0,0291	0,4092
Juveniles	0,2606	0,0811	0,1968
Pollos	-0,7309***	0,0513*	0,0017

Finalmente hay que destacar que se detectó una correlación negativa altamente significativa entre los valores globales de la actividad Δ -ALAD y el Hct (r de Spearman = -0,4623, $p < 0,001$), que también se observó en el grupo de los pollos, aunque con menor significación (r de Spearman = -0,2699, $p < 0,05$), no así en el de los adultos y juveniles (Tabla 23).

II.4. CONCLUSIONES

Comparable a lo que se describe para otras especies de aves, la actividad enzimática Δ -ALAD de la cigüeña blanca ha mostrado una alta sensibilidad a la exposición a diferentes niveles de Pb, con una inhibición dosis dependiente. Esta relación fue evidente incluso con concentraciones de Pb en sangre consideradas bajas ($< 50 \mu\text{g/L}$) siendo mucho más intensas cuando los niveles de Pb en sangre superaron los $200 \mu\text{g/L}$. Al estudiar los datos por grupo de rangos de concentración de Pb, se ha encontrado que concentraciones de Pb $> 30 \mu\text{g/L}$ producen una inhibición significativa ($>$ del 30%) sobre la actividad Δ -ALAD, por lo que podemos establecer esta concentración de Pb como umbral de efecto



significativa sobre la enzima de la cigüeña blanca, siendo este valor inferior al reportado por otros autores en otras especies de aves.

No se encontró correlación significativa entre Pb y Hb, aunque sí una correlación positiva entre Pb y Hct. La actividad Δ -ALAD y el Hct mostraron una correlación negativa significativa, sobre todo cuando los niveles de Pb eran ≥ 100 y < 200 $\mu\text{g/L}$. En este estudio, no se han encontrado evidencias de que valores de Pb en sangre inferiores a 100 $\mu\text{g/L}$ puedan afectar significativamente a la concentración de Hct y Hb, lo que demuestra que la determinación de Δ -ALAD (como biomarcador bioquímico) es más sensible a la exposición al Pb que la determinación del Hct o de la Hb (biomarcadores de efecto).

II.5. REFERENCIAS

- Alaya-Ltifi L., Hayder-Benyahya N., Selmi, S. (2015). Condition and health of rufous bush robin (*Cercotrichas galactotes*) nestlings in a polluted oasis habitat in Southern Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 732–737.
- Alonso J.C., Huecas V., Alonso J.A., Abelenda M., Muñoz-Pulido R., Puerta M.L. (1991). Hematology and blood chemistry of adult white storks (*Ciconia ciconia*). *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 98, 395–397.
- Baos R., Jovani R., Pastor N., Tella J.L., Jiménez B., Gómez G., González M.J., Hiraldo F. (2006). Evaluation of Genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2794–2803.
- Becker P.H. (2003). Chapter 19 Biomonitoring with birds. En: Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G. (eds.). *Trace Metals and Other Contaminants in the Environment*, Elsevier. Volume 6: 677-736.
- Benito V., Devesa V., Muñoz O., Suñer M.A., Montoro R., Baos R., Hiraldo F., Ferrer M., Fernández M., González M.J. (1999). Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci. Total Environ.* 242, 309–323.
- Berglund Å.M., Ingvarsson P.K., Danielsson H., Nyholm N.E.I. (2010). Lead exposure and biological effects in pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) before and after the closure of a lead mine in northern Sweden. *Environ. Pollut.* 158, 1368–1375.
- Bernard A. (2008). Biomarkers of metal toxicity in population studies: research potential and interpretation issues. *J. Toxicol. Environ. Health A* 71, 1259–1265.
- Binkowski Ł.J., Sawicka-Kapusta K. (2015). Lead poisoning and its in vivo biomarkers in Mallard and Coot from two hunting activity areas in Poland. *Chemosphere* 127, 101–108.
- BirdLife International (2017). White Stork (*Ciconia ciconia*). BirdLife species factsheet [WWW Document]. URL <http://datazone.birdlife.org/species/factsheet/White-Stork> (accessed 3.23.17).
- Buekers J., Redeker E.S., Smolders E. (2009). Lead toxicity to wildlife: derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Sci. Total Environ.* 407, 3431–3438.
- Campagna D., Huel G., Girard F., Sahuquillo J., Blot P. (1999). Environmental lead exposure and



- activity of d-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood. *Toxicology* 134,143–152.
- de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Pérez-López M., Soler F., (2014). Breeding near a landfill may influence blood metals (Cd, Pb, Hg, Fe, Zn) and metalloids (Se, As) in white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings. *Ecotoxicology* 23, 1377–1386.
- de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno, D., Castellano, A., Soler-Rodríguez, F., Pérez-López, M., (2015). Biomarkers of oxidative status associated with metal pollution in the blood of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain. *Toxicol. Environ. Chem.* 97, 588–598.
- Espín, S., Martínez-López, E., Jiménez, P., María-Mojica, P., García-Fernández, A.J., 2015. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (Δ -ALAD) activity in four free-living bird species exposed to different levels of lead under natural conditions. *Env. Res* 137, 185–98.
- Franson J.C., Pain D.J. (2011). Lead in birds. En: Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations, 2nd edition, ed. W. Nelson Beyer & James P. Meador. Boca Raton: CRC.
- Gómez-Ramírez, P., Martínez-López, E., María-Mojica, P., León-Ortega, M., García-Fernández, A.J., 2011. Blood lead levels and δ - Δ -ALAD inhibition in nestlings of Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) to assess lead exposure associated to an abandoned mining area. *Ecotoxicology* 20, 131–138.
- Henny C.J., Blus L.J., Hoffman D.J., Sileo L., Audet D.J., Snyder M.R. (2000). Field evaluation of lead effects on Canada geese and mallards in the Coeur d'Alene River Basin, Idaho. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 97–112.
- Holladay S.D., Kerr R., Holladay J.P., Meldrum B., Williams S.M., Gogal Jr.R.M. (2012). Persistent increase of blood lead level and suppression of δ - Δ -ALAD activity in Northern Bobwhite quail orally dosed with even a single 2-mm spent lead shot. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 63, 421–428.
- Kamiński P., Kurhalyuk N., Szady-Grad M., Tkachenko H., Kasprzak M., Jerzak L. (2008). Chemical elements in the blood of white stork *Ciconia ciconia* chicks in differential Poland regions. *Med. Biol. Sci.* 22/4, 31–37.
- Lumeij J.T., 1985. Clinicopathologic aspects of lead poisoning in birds: A review. *Vet. Q.* 7, 133–138.
- Maia A.R., Soler-Rodríguez F., Pérez-López M. (2017). Concentration of 12 Metals and Metalloids in the Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*): Basal Values and Influence of Age and Gender. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73(4), 522-532.
- Martínez-Haro M., Green A.J., Mateo R. (2011). Effects of lead exposure on oxidative stress biomarkers and plasma biochemistry in waterbirds in the field. *Environ. Res.* 111, 530–538.
- Martínez-López E., Martínez J.E., María-Mojica P., Peñalver J., Pulido M., Calvo J.F., García-Fernández A.J. (2004). Lead in feathers and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in three raptor species from an unpolluted Mediterranean forest (Southeastern Spain). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 270–275.
- Meharg A.A., Pain D.J., Ellam R.M., Baos R., Olive V., Joyson A., Powell N., Green A.J., Hiraldo, F. (2002). Isotopic identification of the sources of lead contamination for white storks



- (*Ciconia ciconia*) in a marshland ecosystem (Doñana, SW Spain). *Sci. Total Environ.* 300, 81–86.
- Pain D.J. (1989). Haematological parameters as predictors of blood lead and indicators of lead poisoning in the black duck (*Anas rubripes*). *Environ. Pollut.* 60, 67–81.
- Pattee O.H., Pain D.J. (2003). Lead in the environment. *Handbook of Ecotoxicology* 2, 373–399.
- Peixoto N.C., Roza T., Flores É.M., Pereira M.E. (2003). Effects of zinc and cadmium on HgCl₂- δ -ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol. Lett.* 146, 17–25.
- Pérez-López M., de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Galeano J., Míguez-Santiyán M.P., de Castro-Lorenzo A., Otero-Filgueiras M., Rivas-López O., Soler F. (2016). Concentrations of metals, metalloids, and chlorinated pollutants in blood and plasma of White Stork (*Ciconia ciconia*) nestlings from Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 313–321.
- Rodríguez-Estival J., Barasona J.A., Mateo R. (2012). Blood Pb and Δ -ALAD inhibition in cattle and sheep from a Pb-polluted mining area. *Environ. Pollut.* 160, 118–124.
- Scheuhammer A.M. (1987). Erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase in birds. I. The effects of lead and other metals in vitro. *Toxicology* 45, 155–163.
- Strom S.M., Ramsdell H.S., Archuleta A.S. (2002). Aminolevulinic acid dehydratase activity in American dippers (*Cinclus mexicanus*) from a metal-impacted stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 115–120.
- van Bommel D.M., Boffetta P., Liao L.M., Berndt S.I., Menashe I., Yeager M., Chanock S., Karami S., Zaridze D., Matveev V., Janout V., Kollarova H., Bencko V., Navratilova M., Szeszenia-Dabrowska N., Mates D., Slamova A., Rothman N., Han S.S., Rosenberg P.S., Brennan P., Chow W.H., Moore L.E. (2011). Comprehensive analysis of 5-aminolevulinic acid dehydrogenase (Δ -ALAD) variants and renal cell carcinoma risk among individuals exposed to lead. *PLoS One* 6, e20432.
- Vanparrys, C., Dauwe, T., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., Eens, M. (2008). Metallothioneins (MTs) and δ -aminolevulinic acid dehydratase (Δ -ALAD) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Sci. Total Environ.* 401, 184–193.
- Wang, Q., Zhao, H., Chen, J., Hao, Q., Gu, K., Zhu, Y., Zhou, Y., Ye, L. (2010). δ -Aminolevulinic acid dehydratase activity, urinary δ -aminolevulinic acid concentration and zinc protoporphyrin level among people with low level of lead exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 52–58.
- Williams R.J., Tannenbaum L.V., Williams S.M., Holladay S.D., Tuckfield R.C., Sharma A., Humphrey D.J., Gogal R.M. (2017). Ingestion of a Single 2.3 mm Lead Pellet by Laying Roller Pigeon Hens Reduces Egg Size and Adversely Affects F1 Generation Hatchlings. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73(4), 513-521.

CAPÍTULO III

La cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) como bioindicador de contaminación ambiental: tendencia temporal en los niveles en sangre de Pb, Cd, Hg y As entre 1998/1999 y 2008/2009.



RESUMEN

Los elementos químicos son objeto de preocupación mundial debido a su toxicidad, incluso en pequeñas concentraciones. Por ello, en las últimas décadas se han adoptado varias normativas legales para reducir su uso y exposición, evitando así la contaminación ambiental y los peligros para la salud pública y para los animales, sobre todo por elementos tóxicos como el arsénico (As) y metales pesados (Pb, Cd, Hg). Al evaluar la contaminación ambiental por estos elementos algunas especies de aves se han utilizado con éxito en programas de biomonitorización. La cigüeña blanca es un ave muy representativa en España y actualmente su población está aumentando en Europa. El objetivo de este estudio fue utilizar pollos de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*), como bioindicadores de los niveles ambientales de Pb, Hg, Cd y As, estudiando su tendencia temporal en sangre de pollos para verificar el impacto de algunas de estas medidas restrictivas comparando sus niveles antes (años 1998/99) y después (años 2008/09) de su implementación. Las muestras se tomaron de una colonia cuyas únicas posibles fuentes de contaminación eran la cercanía a una carretera nacional y a un vertedero controlado. Los valores sanguíneos de Pb y Hg disminuyeron significativamente desde 1998/99 hasta 2008/09 ($p < 0,05$). Los niveles medios de Pb cayeron desde $113,4 \pm 87,18 \mu\text{g/L}$ (con el 14,90% de las muestras $> 200 \mu\text{g/L}$, indicando riesgo subclínico para las aves) a $59,96 \pm 20,93 \mu\text{g/L}$ (todas $< 200 \mu\text{g/L}$) en los años 2008/09. Los niveles sanguíneos de As y Cd no fueron estadísticamente diferentes entre fechas, aunque los de As disminuyeron levemente. El Cd solo se detectó en el 26% de las muestras de sangre en 1998/99 y en el 53% de las muestras en 2008/09, pero sus medias y medianas fueron similares. En el muestreo de 1998/99 se observaron correlaciones positivas significativas entre los pares de As-Hg, As-Pb y Hg-Pb. Los resultados indican la efectividad de las medidas restrictivas aplicadas sobre la producción y uso de estos elementos y la utilidad de los pollos de cigüeña blanca como bioindicadores de contaminación por estos compuestos tóxicos.

ABSTRACT

Inorganic chemical elements are of global concern due to their toxicity, even in small concentrations. For this reason, in recent decades several legal regulations have been adopted to reduce their use and exposure, thus avoiding environmental pollution and dangers to public health and animals, especially by toxic elements such as arsenic (As) and different heavy metals (Pb, Cd, Hg). When assessing environmental pollution by these elements, some bird species have been successfully used in biomonitoring programs. The white stork (*Ciconia Ciconia*) is a very representative bird in Spain and its population is currently increasing in Europe. The objective of this study was to evaluate the use of white stork chicks as bioindicators of environmental levels of Pb, Hg, Cd and As, studying their temporal trend in chicks' blood to verify the impact of some of these restrictive measures, comparing their levels before (years 1998/99) and after (years 2008/09) their implementation. Samples were taken from a colony whose only possible sources of contamination were the proximity to a national highway and a controlled urban landfill. Blood Pb and Hg values significantly decreased from 1998/99 to 2008/09 (p



<0.05). Mean Pb levels fell from $113.4 \pm 87.18 \mu\text{g/L}$ at the beginning of the study (with 14.90% of samples > $200 \mu\text{g/L}$, indicating subclinical risk for birds) to $59.96 \pm 20.93 \mu\text{g/L}$ (all < $200 \mu\text{g/L}$) in the years 2008/09. As and Cd blood levels did not statistically differ between dates, although those of As decreased slightly. Cd was only detected in 26% of blood samples in 1998/99 and in 53% of samples in 2008/09, but their means and medians were similar. In 1998/99 sampling, significant positive correlations were observed between the As-Hg, As-Pb and Hg-Pb pairs. The results indicate the effectiveness of the restrictive measures applied on the production and use of these elements and the usefulness of white stork chicks as bioindicators of contamination by these toxic compounds.

III.1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados y el arsénico son componentes habituales en nuestro medio ambiente, donde llegan en bajas concentraciones por causas naturales, teniendo la mayor parte de la contaminación debidas a fuentes antropogénicas (Kahle y Becker, 1999). El arsénico (As), un metaloide, y los metales pesados plomo (Pb), cadmio (Cd) y mercurio (Hg) no juegan un papel fisiológico y pueden provocar efectos tóxicos en animales en dosis relativamente bajas (Gupta, 2012), siendo una seria amenaza para la estabilidad del ecosistema cuando se distribuyen ampliamente en el medio ambiente. Es bien sabido que los metales pesados se biomagnifican cuando los depredadores los ingieren con el consumo de las presas, aumentando el riesgo para los organismos en la parte superior de la cadena alimentaria. Los efectos deletéreos en aves y otros animales están bien descritos (Gupta, 2012; Hoffman *et al.*, 2003; Friend y Franson, 1999; Sánchez-Virosta *et al.*, 2015) y pueden comprender una amplia gama de efectos fisiológicos y de comportamiento, habiéndose descrito en aves efectos negativos sobre la reproducción, la incubabilidad de los huevos, la supervivencia de las crías y el desarrollo neuroconductual (Burger y Gochfeld, 2000).

Las aves juegan un papel importante como bioindicadores de la contaminación ambiental, ya que son conspicuas, relativamente fáciles de observar, uno de los grupos de organismos mejor estudiados y en el foco del interés y preocupación pública (Becker, 2003). La cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) es un ave omnívora e icónica en España, ya que sus nidos se pueden encontrar en muchos tejados de iglesias y edificios de poblaciones más o menos numerosas, así como en las copas de los árboles en muchas partes del país. Se ubica en la parte superior de la cadena alimentaria y, por tanto, puede ser útil como especie centinela (Baos *et al.*, 2006), habiéndose utilizado los pollos para estudiar la presencia de contaminantes (Maia *et al.*, 2017; Pérez-López *et al.*, 2016; De la Casa-Resino *et al.*, 2014, 2015a, 2015b) ya que éstos son alimentados por sus padres del entorno circundante durante las primeras semanas de vida. La movilización de metales desde otros tejidos a sangre es insignificante y, aunque el contenido de metales pesados en los polluelos después de la eclosión puede derivar de su presencia en el huevo, se ha indicado que la contribución del contenido de metales en los huevos sobre la carga metálica en el animal es mínima en comparación con la de la exposición a través del alimento (reflejo de la contaminación en su hábitat) desde la eclosión hasta que empluman (Blanco *et al.*, 2003;



Burger *et al.*, 1993; Gariboldi *et al.*, 2001; Tsipoura *et al.*, 2008). Además, los niveles de metales pesados y As en sangre suelen indicar una exposición reciente a estos xenobióticos y las muestras de sangre tienen la ventaja de ser muestras no destructivas por lo que se utilizan en diversos programas de monitoreo de la fauna (Becker, 2003; Benito *et al.*, 1999; Martínez-López *et al.*, 2005). A pesar de ello, los polluelos de cigüeña blanca no se han utilizado frecuentemente como bioindicadores de las tendencias temporales de los contaminantes, existiendo escasez de datos sobre las concentraciones sanguíneas de Pb, Cd, Hg y As.

Los estudios de biomonitorización a menudo tienen como objetivo el determinar las diferencias en la carga contaminante entre especies y zonas geográficas, siendo menores las veces que se centran en determinar las tendencias temporales de la contaminación por metales en una zona utilizando los principales depredadores de los ecosistemas terrestres (Dietz *et al.* 2006; Bustnes *et al.* 2013; Varela *et al.* 2016). El estudio de tendencias temporales puede sacar a la luz casos extraordinarios de contaminación, la identificación de las fuentes, la detección de variación temporal en los niveles de contaminantes y la evaluación de la efectividad de las medidas destinadas a reducir la contaminación (García-Seoane *et al.*, 2017). En estos casos, muestras como plumas o huevos, de museos aviarios o bancos de muestras, han demostrado ser un material valioso al estudiar la historia de la contaminación por metales pesados (Becker, 2003; García-Seoane *et al.*, 2017; Braune, 2007). Es importante destacar el papel que juegan los animales, y en particular las aves, como centinelas del medio ambiente y por tanto de la salud pública, ya que los seres humanos compartimos el medio y, por tanto, también estamos expuestos a las mismas sustancias (NCR, 1991; Reif, 2011; Van der Schalie *et al.*, 1999).

Para disminuir la contaminación ambiental y evitar los peligros para la salud pública relacionados con los metales pesados y otros elementos tóxicos, las autoridades administrativas han ido adoptando diversas medidas y normativas. De acuerdo con la normativa de la Unión Europea (UE) que regula esta materia, España incorporó como propias sus normas, siendo la más importante al respecto el Real Decreto 1406/1989 que estableció una serie de limitaciones a la comercialización y uso de determinadas sustancias y preparados químicos. Otras normas más específicas son el Real Decreto 45/1996 por el que se regulan diversos aspectos relacionados con las pilas y los acumuladores que contengan determinadas materias peligrosas, y el Real Decreto 785/2001 que prohibió el uso de gasolina con Pb a partir del 1 de agosto de 2001. Estas normativas, y sus posteriores modificaciones, limitaron el uso de diversos compuestos químicos, como el Hg en baterías, los compuestos de As como biocidas y protectores de madera, el Cd y sus compuestos como colorantes o estabilizantes de PVC, y el Pb en gasolinas. Entre otras normativas, las restricciones en la fabricación, el uso y la comercialización de compuestos químicos han sido implementadas en la UE en los últimos años mediante distintos reglamentos, siendo el Reglamento (CE) 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, conocido como Reglamento REACH, la base principal de las nuevas normas. Normativas similares se contemplaron en otros países, como Estados Unidos de Norteamérica con la Ley de gestión de baterías recargables y contenedoras de Hg de 1996 (“Battery Act”), que eliminaba gradualmente el uso de Hg,



así como del Cd y Pb en esos productos, siendo ese mismo año cuando se prohibió la gasolina con Pb.

Si bien con motivo de estas prohibiciones, sobre todo del Pb, se han realizado gran cantidad de estudios sobre la evolución temporal a largo plazo de esos contaminantes en sangre de humanos, son muy pocos los estudios similares realizados con animales, y particularmente en aves. En estas últimas, se han realizado numerosos estudios sobre tendencias temporales de Hg en especies marinas utilizando huevos no eclosionados y plumas (Mallory y Braune, 2018; Braune *et al.*, 2005, Braune, 2007; García-Seoane *et al.*, 2017; Perkins *et al.*, 2020; Burgess *et al.*, 2013). Los estudios de tendencia temporal a largo plazo de otros metales han sido menores y han usado plumas y tejidos procedentes de cadáveres (hígado, riñón, cerebro, huesos) (Helander *et al.*, 2019; García-Fernández *et al.*, 2005; Bustnes *et al.*, 2013; Di Marzio *et al.*, 2020) o huevos (Burger y Gochfeld, 1995). El uso de sangre ha sido mucho más escaso, aunque se ha llegado a indicar que las muestras de un mismo individuo son apropiadas como indicador de exposición en estudios que evalúan los efectos a largo plazo (≥ 1 año) de ciertos metales sobre las aves (Wayland *et al.*, 2007). En algunos casos se ha usado la sangre en estudios a corto plazo (4 años) (Gariboldi *et al.*, 2001), y ha sido muy poco usada en estudios a largo plazo (>10 años) (Albert *et al.*, 2019; Bruggeman *et al.*, 2018; Eleftheriou *et al.*, 2017).

Debido a esta ausencia de estudios sobre el uso de la cigüeña blanca en programas de biomonitorización de contaminantes, particularmente a largo plazo, se utilizó una colonia cigüeña blanca próxima a una carretera principal y cercana a una instalación de tratamiento de residuos sólidos urbanos en Extremadura para conseguir los siguientes objetivos: a) estudiar la evolución temporal de la contaminación por As, Cd, Hg y Pb en un periodo de 10 años (antes y después de la prohibición del uso de Pb en la gasolina y otras restricciones), b) determinar la validez de la sangre de pollos de cigüeñas como muestra no destructiva para este estudio, y c) verificar la efectividad de las medidas legales implementadas para reducir la exposición ambiental a los cuatro elementos tóxicos.

III.2. MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1 Área de estudio

La colonia de cigüeña blanca estudiada está ubicada en una finca ganadera de secano, de pastoreo extensivo de ganado vacuno y pequeños rumiantes, sin zonas de agricultura intensiva o caza cercanas, dentro de la Zona de especial Protección de Aves (ZEPA) de Los Llanos de Cáceres, y a aproximadamente 10 km en línea recta de la ciudad de Cáceres (longitud: -6,45562, latitud: 39,36787), de unos 96000 habitantes. Los nidos se encuentran en una zona aislada de encinar denso (rectangular, de 375 x 300 m), en la copa de las encinas (*Quercus ilex*), colindante con una carretera nacional (N-523) que une las dos grandes ciudades de la región extremeña, Cáceres y Badajoz, y con una intensidad de tráfico de unos 3800 vehículos/día. A unos 4 km en línea recta se encuentra una planta de tratamiento de residuos sólidos urbanos (longitud: -6,431808, latitud: 39,430028),



clasificada en el grupo de vertederos de todo tipo de residuos que reciben más de 10 toneladas al día o con capacidad total de más de 25.000 toneladas, excluyendo inertes, en la que no se lleva a cabo incineración de los mismos (EU-Registry: 000522000), habiéndose documentado la alimentación de cigüeñas en el mismo durante el periodo de cría (Medina *et al.*, 1998). Es bien conocido que la contaminación ambiental tiene una relación directa con las emisiones de vehículos, y que en las cercanías a minas y vertederos de desechos la exposición al Pb y otros metales pesados puede ser muy alta (Fisher *et al.*, 2006).

III.2.2. Toma de muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron recolectadas durante las campañas de anillamiento de los pollos (finales de mayo y principios de junio) realizadas en los años 1998-1999 (n=47) y en los años 2008-2009 (n=34), antes y después de la introducción de regulaciones y restricciones de algunos metales pesados y As, como la prohibición de Pb en gasolinas. Las edades de los polluelos de cigüeña blanca variaron entre tres y seis semanas. Tras la localización e identificación de cada nido, se bajaron los pollos del mismo tomando las máximas precauciones en su manejo para evitar situaciones de estrés prolongado. Tras la toma de varios datos (peso con precisión de ± 1 g, condición corporal, edad estimada) y medidas morfométricas (longitud, anchura y altura del pico; longitud y anchura de la cabeza; longitud del tarso-metatarso; y longitud del ala) se les extrajo sangre de la vena metatarsiana con jeringa de 5 mL heparinizada (heparina de litio) y aguja de calibre 23G. Tras el anillamiento, los pollos fueron devueltos al nido. Las muestras de sangre se refrigeraron hasta su llegada al laboratorio donde una alícuota se trasvasó a crioviales de plástico y se conservó a -80°C hasta su posterior análisis.

El muestreo se desarrolló con la aprobación del Comité de Ética de la Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura (España) y con el permiso de las autoridades regionales (Dirección General del Medio Natural de la Junta de Extremadura).

III.2.3. Análisis de metales pesados y arsénico

Los análisis de As, Pb, Cd y Hg se realizaron mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) en el SAIUEX (Servicio de apoyo a la investigación de la Universidad de la Extremadura) utilizando un equipo NexION 300D ICcP-MS (PerkinElmer, Inc., Shelton, CT). Una descripción detallada se encuentra en el Capítulo I, apartado I.2.2. *Determinación de elementos en sangre*. Los límites de detección (LD) establecidos fueron de 0,5 $\mu\text{g/L}$ para As, 0,25 $\mu\text{g/L}$ para Cd, 3,01 $\mu\text{g/L}$ para Hg y 0,21 $\mu\text{g/L}$ para Pb.

III.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con los programas GraphPad Prism 5[®] version 5.03 para Windows (GraphPad software, Inc., CA) y Microsoft Excel Starter. Para las propuestas estadísticas, los datos del muestreo de los años 1998-1990 se consideraron un grupo independiente, y los de los años 2008-2009 otro. Para el estudio descriptivo de los datos del Cd, a los resultados analíticos inferiores al LD se les asignó un valor correspondiente a la mitad de su LD.



En el estudio descriptivo los datos se expresaron todos en $\mu\text{g/L}$. Para evaluar la normalidad de los datos se aplicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-wilk que revelaron que únicamente se podían considerar como de distribución normal los niveles de Pb, por lo que se decidió utilizar la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para comparar los niveles medios de As, Hg y Pb entre ambos muestreos de sangre. Debido a que más del 50% de los valores del Cd en cada una de las tomas fueron inferiores al LD, no se aplicó ningún estudio estadístico inferencial para este metal. Para el estudio de las correlaciones entre metales de cada muestreo se aplicó el test no paramétrico del coeficiente de correlación de Spearman. El nivel de significación se fijó en todos los casos en $p=0,05$.

III.3. RESULTADOS

En la **Tabla 29** y la **Figura 9** se presenta el estudio descriptivo de los valores de metales en sangre encontrados durante los dos períodos de tiempo en los polluelos de cigüeña blanca, con indicación del resultado de comparación estadística entre ambas tomas.

La concentración sanguínea media de As disminuyó un 23,5% entre 1998/89 y 2008/09, si bien esas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas ($p=0,6255$). Hay que destacar que la variabilidad en los valores de la primera toma fue muy alta, casi del 100%, disminuyendo casi a la mitad en la segunda toma, hecho que se repitió también en los otros elementos.

El 74,47% de las muestras de sangre de 1998/99 y el 52,94% de las muestras de 2008/09 tenían niveles de Cd por debajo de los límites de detección, por lo que, y con fines exclusivamente de estadística descriptiva, se le asignaron unos valores de la mitad del valor del límite de detección, es decir $0,13 \mu\text{g/L}$. La concentración media de Cd en sangre aumentó ligeramente entre 1998/99 ($0,22\pm 0,18 \mu\text{g/L}$) y 2008/09 ($0,26\pm 0,20 \mu\text{g/L}$), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Los niveles sanguíneos de los metales pesados Pb y Hg registraron unas disminuciones significativas entre ambas tomas. Así, el nivel medio de Pb disminuyó a casi la mitad (53,1%), desde $113,44\pm 87,18 \mu\text{g/L}$ en 1998/99 a $59,96\pm 20,93 \mu\text{g/L}$ en 2008/09 ($p=0,0098$), y el de Hg disminuyó significativamente a una tercera parte (33,4%), desde $68,29\pm 62,19 \mu\text{g/L}$ en 1998/99 a $22,81\pm 12,68 \mu\text{g/L}$ en 2008/09 ($p=0,0003$).

**Tabla 29. Valores estadísticos de los niveles de As, Cd, Hg y Pb en sangre de pollos de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) en los años 1998/99 y 2008/09.**

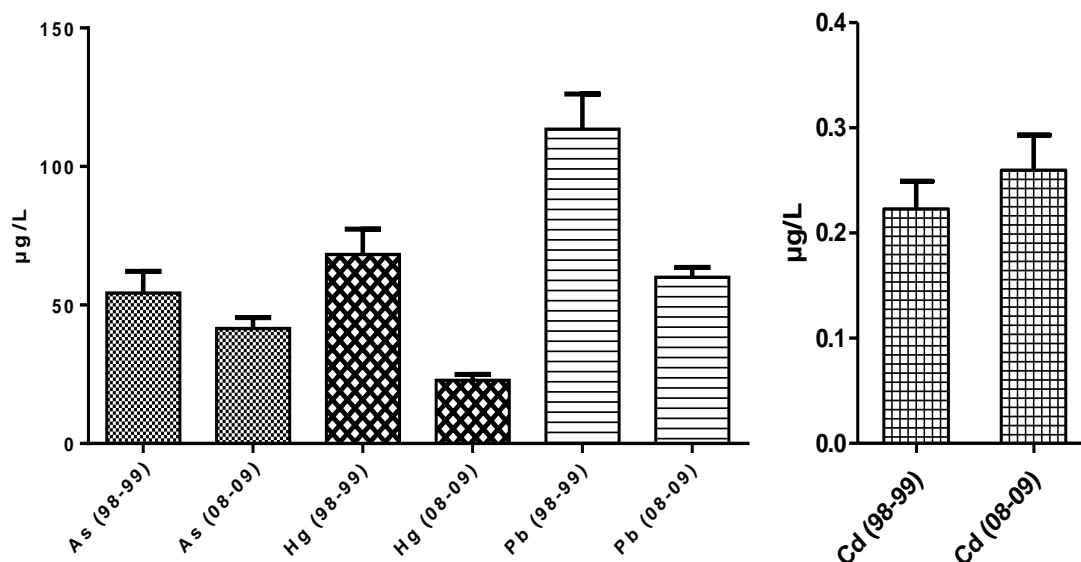
	As ($\mu\text{g/L}$)		Cd ($\mu\text{g/L}$)		Hg ($\mu\text{g/L}$)		Pb ($\mu\text{g/L}$)	
	1998/99	2008/09	1998/99	2008/09	1998/99	2008/09	1998/99	2008/09
	(n= 47)	(n=34)	(n= 47)	(n=34)	(n= 47)	(n=34)	(n= 47)	(n=34)
Media	54,33	41,55	0,22	0,26	68,29	22,81***	113,44	59,96**
Mediana	49,70	39,15	0,13	0,13	53,10	21,70	103,90	55,55
Desv. Est.	53,79	22,89	0,18	0,20	62,19	12,68	87,18	20,93
EEM^a	7,85	3,93	0,03	0,03	9,07	2,17	12,72	3,59
Coef.Var.	99,02	55,09	80,98	74,89	91,07	55,61	76,85	34,91
Mínimo	1,63	10,40	0,13	0,13	3,30	5,23	8,62	24,50
Máximo	268,30	116,60	0,78	1,12	289,20	73,00	399,00	100,10
n<DL^b	0	0	35	18	0	0	0	0

**Diferencia estadísticamente significativa ($<0,05$) respecto a la toma inicial.

***Diferencia estadísticamente significativa ($<0,001$) respecto a la toma inicial.

^a Error estándar de la media

^b Número de muestras con niveles inferiores al límite de detección.

**Figura 9. Representación gráfica de los niveles medios de As, Cd, Hg y Pb en sangre de pollos de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) en los años 1998/99 y 2008/09.**



Se realizó también un estudio de correlación entre metales para cada uno de los periodos de toma de muestras, si bien no se contempló el Cd por su alto número de datos inferiores al LD. El resultado de este estudio aparece en la **Tabla 30** y su representación gráfica en la **Figura 10**. Como se observa, en el muestreo de los años 1998/99 se encontraron correlaciones positivas altamente significativas entre los pares de los tres elementos estudiados: As-Pb, As-Hg y Pb-Hg. Sin embargo esas correlaciones significativas ya no existieron en el muestreo de los años 2008/09, si bien el par As-Hg mostró una tendencia a la correlación cercana a ser significativa ($p=0,0572$).

Tabla 30. Correlaciones entre las concentraciones sanguíneas de As, Hg y Pb en polluelos de cigüeña blanca, entre los años 1998/99 y 2008/09.

		1998/99	2008/09
Pb-Hg	r Spearman	0,6006 ***	0,1961
	Valor P (2-colas)	<0,0001	0,2665
Pb-As	r Spearman	0,7647***	0,2159
	Valor P (2-colas)	<0,0001	0,2201
As-Hg	r Spearman	0,7997***	0,3293
	Valor P (2-colas)	<0,0001	0,0572

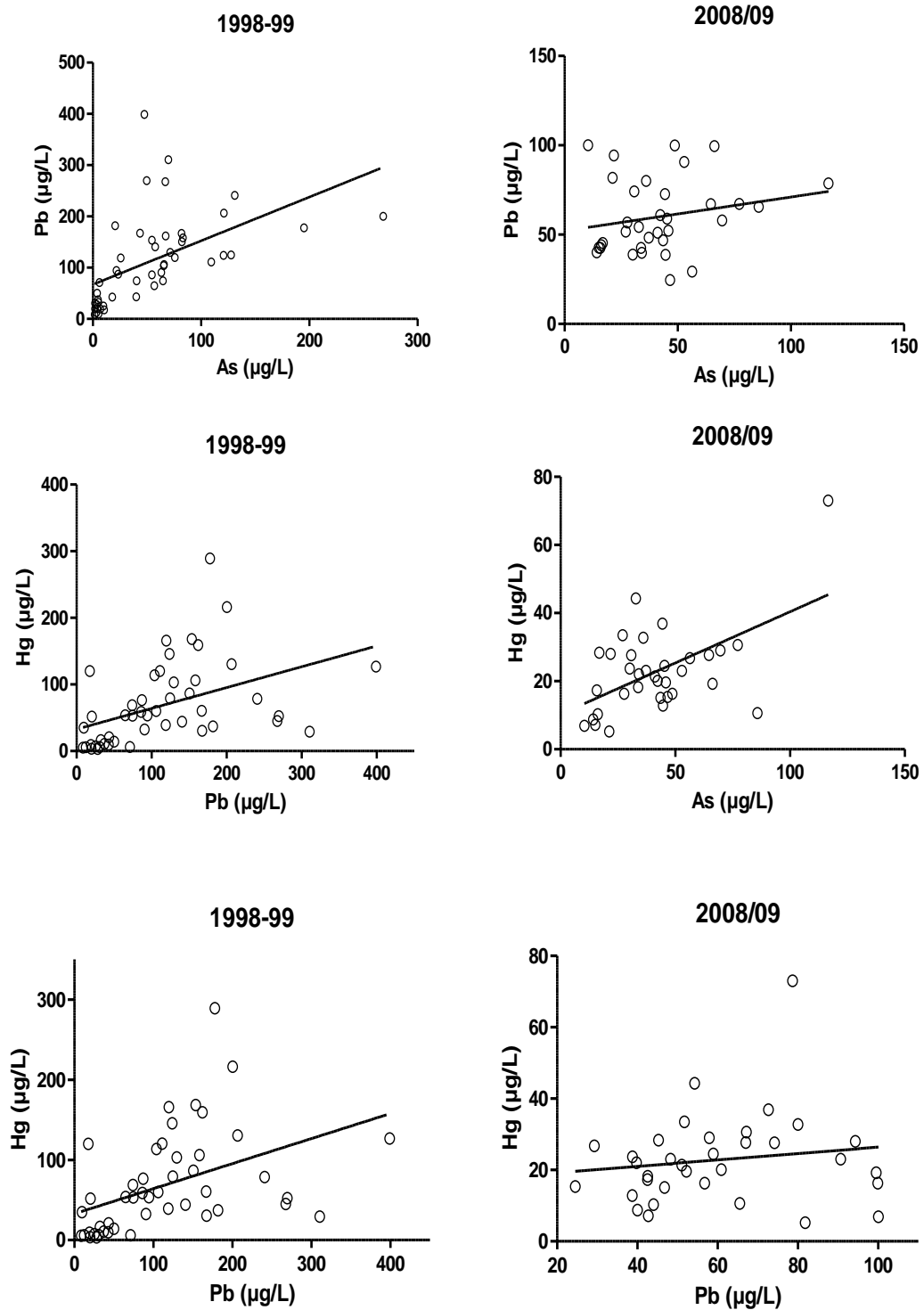


Figura 10. Representación gráfica de las correlaciones entre los niveles medios de As, Cd, Hg y Pb en sangre de pollos de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) en los años 1998/99 y 2008/09.



III.4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se han determinado las concentraciones sanguíneas de cuatro elementos químicos, los metales pesados Pb, Cd y Hg y el metaloide As, considerados como los de mayor toxicidad, lo que origina preocupación en los ámbitos clínico, ambiental y de salud pública. Por ello, estos elementos son objeto de monitorización en distintas especies animales (biomonitorización) en todo el mundo, entre ellas las aves.

En nuestro estudio, con excepción del Cd, los valores medios de los demás elementos químicos estudiados en sangre disminuyeron de forma apreciable en el periodo de 10 años comprendido entre los años 1998/99 y 2008/09. La variabilidad de las medias (coeficiente de variación) observada en todos los casos fue la habitual que se suele encontrar en estudios de biomonitorización de estos elementos en sangre de aves (Baos *et al.*, 2006).

El uso de sangre de animales salvajes en el estudio de las evoluciones temporales de la contaminación ambiental es un aspecto muy interesante, ya que además de poder demostrar la existencia de exposiciones recientes a xenobióticos también tiene la ventaja de que es una muestra no destructiva. Ello permite la supervivencia de los animales y, al ser obtenida de animales vivos y aparentemente sanos, no está afectados por las posibles alteraciones cuando se usan tejidos de cadáveres no muy frescos, en los que se puede producir descomposición de los tejidos tras la muerte o el padecimiento previo de patologías que pueden alterar su composición. Por ello, aunque no tan extendido en aves como el uso de vísceras (hígado, riñón), huesos, huevos o plumas (Vizuet *et al.*, 2019), la sangre también es usada en diversos programas de biomonitorización (Becker, 2003; Benito *et al.*, 1999; Espín *et al.*, 2021; Gariboldi *et al.*, 2001; Martínez-López *et al.*, 2005; Sánchez-Virosta *et al.*, 2015). La sangre es fácil de obtener y manipular, y además se puede almacenar en congelación durante bastante tiempo sin que afecte a los resultados del análisis de metales realizado por ICP-MS (Schütz *et al.*, 1996).

En la fecha del estudio, la norma básica en la UE que regulaba los compuestos químicos era la Directiva 76/769/CEE del Consejo, que no se transpuso en España hasta 1989 por el Real Decreto 1406/1989, que sufrió distintas modificaciones mediante órdenes ministeriales. En estas normas se contemplaban restricciones para Pb, Cd, As y Hg, que se fueron incorporando y modificando en distintos tiempos. También hay que tener en cuenta las limitaciones impuestas por otras normas genéricas, como el Real Decreto 45/1996, sobre eliminación de pilas y acumuladores que contengan Hg, Cd y Pb y el Real Decreto 785/2001 que prohibió el uso de gasolina plomada.

El **cadmio** se puede liberar al medio ambiente durante el procesamiento de otros metales como el cobre, por su uso en baterías de Ni-Cd, en electrónica, en estabilizadores de plástico, revestimientos y en ciertos pigmentos (Levengood y Beasley, 2007). En nuestro estudio no encontramos variaciones entre los distintos años de muestreo y un alto porcentaje de valores fue inferior al límite de detección, lo que suele ser habitual en estos estudios con aves (Martínez-López *et al.*, 2005). Incluso los niveles medios de Cd en nuestro estudio fueron similares e inferiores a los referidos por otros autores también en sangre de cigüeña blanca (Baos *et al.*, 2006; Benito *et al.*, 1999). Por ello, tenemos que considerar que partíamos de una situación de nula o escasa contaminación por Cd en el



entorno de la colonia estudiada. Esto no es extraño, puesto que las medidas restrictivas sobre limitación del uso del Cd para proteger el medio ambiente se implementaron con anterioridad a nuestro estudio, mediante la Orden de 31 de agosto de 1992, que modificaba el Real Decreto 1406/1989 incorporando las restricciones al Cd impuestas por la Directiva 91/338/CEE y, posteriormente, el Real Decreto 45/1996 prohibió las pilas y acumuladores que contuvieran más de 0,025 % en peso de Cd.

El **arsénico** puede considerarse un elemento omnipresente, siendo relativamente común en el agua, el aire, el suelo y los tejidos vivos (Tsipoura *et al.*, 2008). Su origen puede ser de fuentes naturales (menas, minerales, volcanes), de productos comerciales (insecticidas, herbicidas, cebos para hormigas, gasolina plomada) y medicinales (para el tratamiento de la tripanosomiasis y la filariosis canina) (Gupta, 2012; Tsipoura *et al.*, 2008). Los niveles de As en sangre encontrados en ambos periodos de muestreo no variaron significativamente, pero indican una tendencia clara a la disminución. Sin embargo, conviene señalar que en ambos periodos estos niveles medios fueron superiores (aproximadamente el doble) a los referidos por Benito *et al.* (1999) y Baos *et al.* (2006) en sangre de pollos de cigüeña blanca en el entorno del Parque Nacional de Doñana tras el vertido de lodos de la mina de Aznalcóllar ocurrido en 1998, que fueron de $29,14 \pm 22,88$ $\mu\text{g/L}$ en el año 1999 y de $21,06 \pm 12,82$ $\mu\text{g/L}$ en el año 2002. Las medidas restrictivas sobre el As han sido bastante progresivas en el tiempo, y explican la disminución de sus niveles en nuestro estudio. La primera de ellas fue la Orden de 14 de diciembre de 1990 (incorpora la Directiva 89/677/CEE) prohibiendo su uso contra las incrustaciones de seres vivos en cascos de barco y diversos objetos sumergidos de piscicultura, en la protección de la madera, y en el tratamiento de aguas industriales. Posteriormente, esas restricciones fueron más severas y se ampliaron a su uso en la impregnación de hilo y textiles industriales pesados mediante la Orden de 1 de febrero de 1996 (incorpora la Directiva 94/60/CEE), la Orden PRE/2277/2003 de 4 de agosto de 2003 (incorpora la Directiva 2003/2/CE) y la Orden PRE/2772/2007 de 25 de septiembre (incorpora la Directiva 2006/139/CE).

El **mercurio** se libera en la naturaleza por la actividad volcánica, el lecho rocoso expuesto y por actividades antropogénicas como procesamiento de metales, fundición, desechos e incineración, minería, quema de combustibles fósiles, y se ha utilizado ampliamente en barómetros, termómetros, interruptores eléctricos, luces fluorescentes, amalgamas dentales (Levengood y Beasley, 2007). Se han estudiado ampliamente sus efectos adversos y distribución en las aves (Burger y Gochfeld, 1997). En sangre de cigüeñas blancas de una colonia en una zona densamente industrializada se han llegado a detectar valores superiores a los 700 $\mu\text{g/L}$ (Cabo *et al.*, 2012). En el presente estudio, los niveles de Hg en sangre disminuyeron significativamente con el tiempo, llegando a ser en el segundo muestreo una tercera parte de los niveles del muestreo inicial, y aproximadamente la mitad de los observados por Cabo *et al.* (2012) en una colonia situada en un área no industrializada en los años 2010/11 (40,08 $\mu\text{g/L}$).

La importante disminución de los niveles de Hg tendría su explicación en las medidas correctoras implantadas por diversas normas legales que, al igual que en el caso del As, también han sido bastante progresivas en el tiempo. La primera de ellas también fue la



citada Orden de 14 de diciembre de 1990 prohibiendo los mismos usos que para el As. El Real Decreto 45/1996 prohibió las pilas y acumuladores que contuvieran más de 25 mg de Hg por elemento. Posteriormente, las restricciones se ampliaron al contenido de Hg en las pilas mediante la Orden de 25 de octubre de 2000 (incorpora la Directiva 98/101/CEE y modifica el Real Decreto 45/1996) prohibiendo las pilas con más del 0,0005% de Hg en peso. En 2005, la UE estableció una estrategia comunitaria sobre el Hg en la que consideró necesario introducir mayores restricciones a nivel comunitario sobre la comercialización de determinados equipos de medición y control que lo contienen para uso por parte de los consumidores.

El **plomo** ha sido ampliamente utilizado en plomos de pesca, munición de perdigones, balas, baterías, pinturas, pipas de agua, así como en gasolinas. Sus emisiones a la atmósfera han estado relacionadas principalmente con el uso de compuestos de Pb como antidetonante en las gasolinas (Levengood y Beasley, 2007). La prevalencia de intoxicaciones por plomo en aves fue básica para el establecimiento de normas y políticas de reducción del uso del Pb, incluyendo las gasolinas plomadas (Kalisińska, 2019). En una reciente revisión (Baranowska-Bosiacka *et al.*, 2019) se citan numerosos estudios que demuestran que la cercanía a una carretera de tráfico denso aumentó de forma importante los niveles de Pb en la fauna que vive cerca de la misma, siendo significativo que esta revisión cite casos de mamíferos, pero ninguno de aves.

La interpretación de la concentración de Pb en sangre tiene ciertos matices, ya que existe disparidad entre especies, y que puede atribuirse a la ruta de exposición, que puede ser por inhalación o por ingestión (Baos *et al.*, 2006; Franson y Pain, 2011). Según algunos autores, las concentraciones basales de Pb en sangre en las aves suelen ser <200 µg/L, y más generalmente <100 µg/L (Franson y Pain, 2011; Pain, 1989). En anseriformes, valores en sangre superiores a 200-500 µg/L se relacionan con intoxicaciones subclínicas y superiores a 500-1000 µg/L con intoxicaciones clínicas (Franson y Pain, 2011). Aproximadamente el 14,90% de las muestras de los años 1998/99 tenían valores superiores a 200 µg/L, mientras que en 2008/099, la concentración más alta fue de 100 µg/L. Los niveles medios en los años 1998/99 fueron más altos que los determinados en 1999 en pollos de cigüeña blanca de la zona cercana al vertido de Aznalcóllar (Baos *et al.*, 2006). Valores medios similares a nuestro estudio se han encontrado en cigüeñas de una colonia cercana a un área industrializada (222,6 µg/L), mientras que los de otra en entorno no contaminado eran sensiblemente menores (56,2 µg/L) (Cabo *et al.*, 2012).

La disminución significativa de los niveles de Pb en sangre en nuestro trabajo estaría relacionada con la implementación de normas restrictivas sobre el mismo, y especialmente las relacionadas con la prohibición de la gasolina plomada, ya que esta es la responsable de la mayor parte de la contaminación ambiental producida por Pb. En la UE, la Directiva 98/70/CE del Parlamento y del Consejo prohibió la gasolina plomada en 1998, pero en España esta directiva se transpuso por el Real Decreto 785/2001 que prohibió el uso de gasolina plomada a partir del 1 de agosto de 2001. En Murcia, un estudio con sangre de cabras comparando los niveles de Pb en una explotación cercana a una carretera se comprobó una disminución significativa (1,5 veces) entre los años 1992 y 2001, atribuyéndose a las normas implementadas entre esos años (García-Fernández *et*



al., 2003). En circunstancias similares, García-Fernández *et al.* (2005) observaron en hígados y cerebros de cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) obtenidos en el sureste de España una disminución significativa de Pb en los ejemplares de áreas rurales y urbanas en muestreos llevados a cabo en los años 1995-97 (antes de la prohibición de la gasolina plomada) respecto a muestreos en el año 2001 (tras la prohibición de la gasolina plomada). Igualmente, y relacionada con dicha prohibición, se observó una importante disminución (94% aproximadamente) de Pb en plumas de cárabo común (*Strix aluco*) en Noruega entre los años 1986 y 2005 (Bustnes *et al.*, 2013). También hay que considerar la Orden de 14 de diciembre de 1990 (transposición de la Directiva 89/677/CEE) prohibiendo el uso de pigmentos de sales de Pb en pinturas, y el Real Decreto 45/1996 que prohibió las pilas y acumuladores con más del 0,4 % en peso de Pb.

Los datos obtenidos en nuestro estudio también están en consonancia con la tendencia general importante en la UE a la disminución de las emisiones al aire de los metales pesados Cd, Hg y Pb (European Environment Agency, 2019), que indica que desde 1990 las emisiones aéreas de Pb han disminuido un 93%, las de Hg un 72% y las de Cd un 64%, ocurriendo la mayoría de la disminución de Pb en el año 2004, principalmente como resultado de la prohibición de la gasolina plomada en Europa.

Durante y, sobre todo, después del periodo de nuestro trabajo han sido muy numerosas las normas legales que se han aprobado y aplicado para la reducción el riesgo de exposición a Pb, Cd y Hg para los seres humanos y el medio ambiente.

Así, durante el último muestreo, la Directiva 76/769/CEE fue derogada y sustituida por el Reglamento 1907/2006 (reglamento REACH), pero con efectos desde el 1 de junio de 2009; el Real Decreto 45/1996 fue sustituido por el Real Decreto 106/2008 que prohibió la puesta en el mercado de pilas y acumuladores que contuvieran más del 0,002% de Cd en peso; y la Orden PRE/222/2009 impuso restricciones a la comercialización de determinados dispositivos de medición que contuvieran Hg.

Con posterioridad a nuestro estudio, el Real Decreto 219/2013 limitó, con algunas excepciones, la introducción en el mercado de aparatos eléctricos y electrónicos (lámparas, pastas de soldadura, aleaciones, materiales homogéneos, condensadores...) con componentes que contuvieran concentraciones o cantidades de Hg, Pb o Cd mayores de las indicadas.

A nivel de la UE, en el año 2009 el Reglamento 552/2009 prohibió la fabricación y la comercialización de termómetros para la fiebre y otros dispositivos de medida (manómetros, tensiómetros, barómetros...) que contuvieran Hg, de uso para el público en general; en el año 2012, el Reglamento 847/2012 prohibió la comercialización de esos dispositivos de medida destinados a usos industriales y profesionales; y el Reglamento 848/2012 prohibió, a partir del 10 de octubre de 2017, la fabricación, comercialización y utilización de cinco compuestos de fenilmercurio, utilizados como catalizadores en la fabricación de poliuretano. El Reglamento de ejecución 540/2011 no contempla al Hg y sus compuestos en la lista de productos fitosanitarios, y tampoco están autorizados su comercialización y uso como biocidas por el Reglamento 528/2012. Finalmente, el Reglamento 2017/852, que es de aplicación desde el 1 de enero de 2018, estableció las



medidas y condiciones relativas al uso, el almacenamiento y el comercio de Hg, sus compuestos y mezclas, así como la fabricación, uso y comercio de productos con Hg añadido, así como a la gestión de sus residuos, con el fin de garantizar un alto grado de protección de la salud humana y del medio ambiente frente a las emisiones y liberaciones antropogénicas de Hg y sus compuestos.

Tal es la importancia del Hg como elemento tóxico, que en Ginebra en el año 2013 se aprobó el Convenio de Minamata sobre el Mercurio (<http://www.mercuryconvention.org/>) por parte del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), que entró globalmente en vigor en 2020. Este convenio prohíbe la producción, importación y exportación de instrumentos de observación (termómetros, barómetros, etc.) que contengan Hg después de 2020. Los aspectos principales recogidos en este Convenio son la prohibición de nuevas minas, la eliminación gradual de las minas existentes, medidas de control de las emisiones a la atmósfera y la prohibición de la fabricación, importación y exportación de productos de Hg.

En este trabajo, salvo para el Cd (debido al bajo número de valores cuantificables), también se estudiaron las correlaciones entre los metales en los dos muestreos realizados. Únicamente se encontraron correlaciones significativas en el muestreo de los años 1998/99 en todos los pares de Pb, As y Hg, no existiendo ninguna correlación significativa en el muestreo de los años 2008/09. La existencia de una mayor contaminación ambiental, con la posibilidad de animales que puedan ingerir un rango mayor de estos contaminantes, pudo propiciar la aparición de esta correlaciones, que desaparecieron cuando los niveles ambientales (y por tanto en la sangre) fueron menores, lo que hizo que la variabilidad en el segundo muestreo fuese menor que en el primero. Si bien existen más estudios de correlaciones entre metales en diferentes tejidos de aves, para el caso de la sangre son mucho menores, habiéndose indicado correlaciones significativas en sangre de pollos de cigüeña blanca de Extremadura (De la Casa-Resino *et al.* (2014), aunque en otras aves no se han encontrado (Blanco *et al.*, 2003). Algunas correlaciones entre metales pueden explicarse por el uso de rutas metabólicas similares (Liu *et al.*, 2010; Pérez-López *et al.*, 2008).

III.5. CONCLUSIONES

La cigüeña blanca puede incluirse como una especie en la posición más alta de la cadena alimentaria en su entorno y tiene casi todas las características descritas para las aves para ser un buen bioindicador como lo describe Becker (2003). En nuestro estudio, se ha comprobado una disminución clara en los niveles medios de As, y muy significativa en los de Pb y Hg entre 1998/99 y 2008/09, junto con una menor variabilidad, que debe ser relacionada directamente con la implementación de normas legales sobre restricciones y regulaciones en la fabricación, uso y comercialización de estos elementos tóxicos. El Cd no ha mostrado variación si bien en ambos muestreos sus niveles fueron muy bajos.



Nuestros datos demuestran la utilidad de la cigüeña blanca como bioindicador de contaminación, y de la sangre de pollos como muestra no destructiva en los estudios de biomonitorización ambiental de As, Cd, Hg y Pb.

Debido a la introducción de nuevas medidas restrictivas con posterioridad a nuestro estudio, sería interesante la realización próximamente de un nuevo muestreo similar en la misma colonia para comprobar si esas restricciones han contribuido aún más a la reducción de los niveles ambientales de estos cuatro elementos químicos tóxicos.

III.6. REFERENCIAS

- Albert C., Renedo M., Bustamante P., Fort J. (2019). Using blood and feathers to investigate large-scale Hg contamination in Arctic seabirds: A review. *Environ. Res.* 177: 108588.
- Baos R., Jovani R., Pastor N., Tella J.L., Jiménez B., Gómez G., González M.J., Hiraldo F. (2006). Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(10): 2794–2803.
- Baranowska-Bosiacka I., Korbecki J., Marchlewicz M. (2019). Lead, Pb. En: Kalisińska E. (ed.), *Mammals and Birds as Bioindicators of Trace Element Contaminations in Terrestrial Environments*. Springer Nature Switzerland, pp 563-592.
- Becker P.H. (2003). Biomonitoring with birds. En: Markert A.M. Breure H.G, Zechmeister, (eds.) *Bioindicators and biomonitors*. Elsevier, pp 677-735.
- Benito V., Devesa V., Muñoz O., Suñer M.A., Montoro, Baos R., Hiraldo F., Ferrer M., Fernández M., González M.J. (1999). Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcollar mine. *Sci. Total Environ.* 242: 309-323.
- Blanco G., Frías O., Jiménez B., Gómez G. (2003). Factors influencing variability and potential uptake routes of Heavy metals in black kites exposed to emissions from a Solid-waste incinerator. *Environ. Toxicol. and Chem.* 22(11): 2711–2718.
- Braune B.M. (2007). Temporal trends of organochlorines and mercury in seabird eggs from the Canadian Arctic, 1975–2003. *Environ. Pollut.* 148: 599–613.
- Braune B.M., Outridge P.M., Fisk A.T., Muir D.C., Helm P.A., Hobbs K., Hoekstra P.F., Kuzyk Z.A., Kwan M., Letcher R.J., Lockhart W.L., Norstrom R.J., Stern G.A., Stirling I. (2005). Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: an overview of spatial and temporal trends. *Sci. Total Environ.* 351-352: 4-56.
- Bruggeman J.E., Route W.T., Redig P.T., Key R.L. (2018). Patterns and trends in lead (Pb) concentrations in bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) nestlings from the western Great Lakes region. *Ecotoxicology.* 27(5) :605-618.
- Burger J., Rodgers J.A., Gochfeld M. (1993). Heavy metal and selenium levels in endangered wood storks *Mycteria americana* from nesting colonies in Florida and Costa Rica. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 24(4): 417-420.



- Burger J., Gochfeld M. (1995). Heavy metal and selenium concentrations in eggs of herring gulls (*Larus argentatus*): Temporal differences from 1989 to 1994. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 192–197.
- Burger J., Gochfeld M. (1997). Risk, Mercury Levels, and Birds: Relating Adverse Laboratory Effects to Field. *Biomon. Environ. Research* 75: 160–172.
- Burger J., Gochfeld M. (2000). Metals in albatross feathers from Midway Atoll: influence of species, age, and nest location. *Environ. Res.* 82(3): 207–221.
- Burgess N.M., Bond A.L., Hebert C.E., Neugebauer E., Champoux L. (2013). Mercury trends in herring gull (*Larus argentatus*) eggs from Atlantic Canada, 1972–2008: Temporal change or dietary shift?. *Environ. Pollut.* 172: 216–222.
- Bustnes J.O., Bårdsen B.J., Bangjord G., Lierhagen S., Yoccoz N. (2013). Temporal trends (1986–2005) of essential and non-essential elements in a terrestrial raptor in northern Europe *Sci. Total Environ.* 458–460: 101–106.
- Cabo P., Espín S., Martínez-López E., Roscales J.L., Jiménez B., García-Fernández, A.J. (2012). Metales pesados en sangre de pollos de Cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) de Madrid y Aragón. *Rev. Toxicol.* 29: 51–72.
- de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Pérez-López M., Soler F. (2014). Breeding near a landfill may influence blood metals (Cd, Pb, Hg, Fe, Zn) and metalloids (Se, As) in white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings. *Ecotoxicology* 23(8): 1377–1386.
- de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Pérez-López M., Soler F. (2015a). Chlorinated pollutants in blood of white stork nestlings (*Ciconia ciconia*) in different colonies in Spain. *Chemosphere* 118: 367–372.
- de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Soler Rodríguez F., Pérez-López M. (2015b) Biomarkers of oxidative status associated with metal pollution in the blood of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain. *Toxicol. Environ. Chem.* 97(5): 588–598.
- Dietz R., Riget F., Born E.W., Sonne C., Grandjean P., Kirkegaard M., Olsen M.T., Asmund G., Renzoni A, Baagøe H., Andreassen C. (2006). Trends in mercury in hair of Greenlandic polar bears (*Ursus maritimus*) during 1892–2001. *Environ. Sci. Technol.* 40(4): 1120–1125.
- Di Marzio A., Lambertucci S.A., García-Fernández A.J., Martínez-López E. (2020). Temporal changes in metal concentrations in Andean condor feathers: a potential influence of volcanic activity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27: 25600–25611.
- Directiva 76/769/CEE del Consejo, de 27 de julio de 1976, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. (DOCE 262 de 27/09/1976).
- Directiva 89/677/CEE del Consejo, por la que se modifica por octava vez la Directiva 76/769/CEE, prevé determinadas limitaciones a la comercialización y el uso del arsénico. (DOCE 398 de 30/12/1989).
- Directiva 91/338/CEE del Consejo de 18 de junio de 1991 por la que se modifica por décima vez la Directiva 76/769/CEE relativa a la aproximación de las disposiciones legales,



reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. (DOCE 186 de 12/07/1991).

Directiva 94/60/CEE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 1994, por la que se modifica por decimocuarta vez la Directiva 76/769/CEE relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos. (DOCE 365 de 31/12/1999).

Directiva 98/70/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de octubre de 1998, relativa a la calidad de la gasolina y el gasóleo y por la que se modifica la Directiva 93/12/CEE del Consejo. (DOCE 350 de 28/12/1998).

Directiva 98/101/CE de la Comisión, de 22 de diciembre de 1998, por la que se adapta al progreso técnico la Directiva 91/157/CEE del Consejo relativa a las pilas y a los acumuladores que contengan determinadas materias peligrosas. (DOCE 1 de 05/01/1999).

Directiva 2003/2/CE de la Comisión, de 6 de enero de 2003, que limita la comercialización y el uso del arsénico (décima adaptación al progreso técnico de la Directiva 76/769/CEE). (DOUE 4 de 09/01/2003).

Directiva 2006/139/CE de la Comisión, de 20 de diciembre de 2006, por la que se modifica la Directiva 76/769/CEE del Consejo en cuanto a las restricciones de la comercialización y el uso de los compuestos de arsénico con el fin de adaptar su anexo I al progreso técnico (DOUE 384 de 29/12/2006).

Eleftheriou A., Murphy L., Welte S. (2017). Evaluation of lead and mercury prevalence in bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) from the mid-atlantic united states. *J. Zoo Wildl. Med.* 48(3): 910-914.

Espín S., Andevski J., Duke G., Eulaers I., Gómez-Ramírez P., Hallgrímsson G.T., Helander B., Herzke D., Jaspers V.L.B., Krone O., Lourenço R., María-Mojica P., Martínez-López E., Mateo R., Movalli P., Sánchez-Virosta P., Shore R.F., Sonne C., van den Brink N.W., van Hattum B., Vrezec A., Wernham C., García-Fernández A.J. (2021). A schematic sampling protocol for contaminant monitoring in raptors. *Ambio.* 50(1): 95-100.

European Environment Agency (2019). Heavy metal emissions. Recuperado el 05/12/2020 de <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/eea32-heavy-metal-hm-emissions-1/assessment-10>.

Fisher I.J., Pain D. J., Thomas V.G. (2006). A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. *Biol. Conservation*, 131:421-432.

Franson J.C., Pain D.J. (2011). Lead in birds. En: Beyer, W.N., Meador, J.P. (eds), *Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations* (2a ed). CRC Press Taylor Francis Group, Boca Raton, Florida, pp 563-593.

Friend M., Franson J.C. (1999). *Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds*. Us Fish and wildlife Service, Biological Resources Division.

García-Fernández A.J., Navas I., Romero D., Gomez-Zapata M., Luna A. (2003) Influence of leaded-gasoline regulations on the blood lead concentrations in Murciano-Granadina



- goats from Murcia Region, Southeast Spain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 70: 1178–1183.
- García-Fernández A.J., Romero D., Martínez-López E., Navas I., Pulido M., María-Mojica P. (2005). Environmental lead exposure in the European kestrel (*Falco tinnunculus*) from Southeastern Spain: the influence of leaded gasoline regulations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74: 314–319.
- García-Seoane R., Varela Z., Carballeira A., Aboal J.R., Fernández J.A. (2017). Temporal trends in mercury concentrations in raptor flight feathers stored in an environmental specimen bank in Galicia (NW Spain) between 2000 and 2013. *Ecotoxicology*. 26(2): 196-201.
- Gariboldi J.C., Bryan A.L., Jr. Jagoe C.H. (2001). Annual and regional variation in mercury concentrations in wood stork nestlings. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1551-1556.
- Gupta R.C. (Ed.) (2012). *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles* (2a ed). Academic Press.
- Helander B., Sundbom M., Runkel A.A., Bignert A. (2019). Temporal changes in concentrations of lead and other trace metals in free-ranging eurasian Eagle owls *Bubo bubo* in Sweden. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 77(3): 377-389.
- Hoffman D.J., Rattner, B.A., Burton G.A., Cairns J. (2003). *Handbook of Ecotoxicology* (2a ed). Lewis Publishers.
- Kahle S., Becker P.H. (1999). Bird blood as bioindicators of mercury in the environment. *Chemospher.* 39(14): 2451-2457.
- Kalisińska E. (2019). Endothermic Animals as Biomonitors of Terrestrial Environments. En: Kalisińska E. (ed.) *Mammals and Birds as Bioindicators of Trace Element Contaminations in Terrestrial Environments.*, Springer Nature Switzerland, pp 21-53.
- Liu J., Goyer A., Waalkes M.P. (2010). Toxic effects of Metals Chapter 23. En: Klaasen I., Curtis D., Watkins J.B. (eds.) *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology* (2a ed). McGraw-Hill, pp. 323-333.
- Maia A.R., Soler-Rodríguez F., Pérez-López M. (2017). Concentration of 12 Metals and Metalloids in the Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*): Basal Values and Influence of Age and Gender. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73(4): 522–532.
- Mallory M.L., Braune B.M. (2018). Do concentrations in eggs and liver tissue tell the same story of temporal trends of mercury in high Arctic seabirds? *J. Environ Sci.* 68: 65-72.
- Martínez-López E., María-Mojica P., Martínez J.E., Calvo J. E., Romero D., García-Fernández A.J., (2005). Cadmium in feathers of adults and blood of nestlings of three raptor species from a nonpolluted Mediterranean forest, Southeastern Spain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74: 477–484.
- Medina F., Avilés J.M., Sánchez A. (1998). Diferencias intraespecíficas en el uso de un vertedero por parte de la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) en el oeste de la Península Ibérica. *Butlletí del Grup Català d'Anellament* 15: 9-14.
- NCI (1991). *National Research Council. Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards.* Washington, DC: National Academy Press.



- Orden de 14 de diciembre de 1990 por la que se actualiza el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. (BOE 299 de 14/12/1990).
- Orden de 31 de agosto de 1992 por la que se actualiza el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. (BOE 218 de 10/09/1992).
- Orden de 1 de febrero de 1996 por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. [Disposición derogada]. (BOE 33 de 7/02/1996).
- Orden de 25 de octubre de 2000 por la que se modifican el anejo 1 del Real Decreto 45/1996, de 19 de enero, por el que se regulan diversos aspectos relacionados con las pilas y los acumuladores que contengan determinadas materias peligrosas, y el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. (BOE. 258 de 27/10/2000).
- Orden PRE/2277/2003, de 4 de agosto, por la que se modifica el Anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. Arsénico y colorante azul (BOE 190 de 9/08/2003).
- Orden PRE/2772/2007, de 25 de septiembre, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (compuestos de arsénico). (BOE 232 de 27/09/2007).
- Orden PRE/222/2009, de 6 de febrero, por la que se modifica el anexo I del Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos (dispositivos de medición que contienen mercurio). (BOE 37 de 12/02/2009).
- Pain D.J (1989). Haematological parameters as predictors of blood lead and indicators of lead poisoning in the black duck (*Anas rubripes*). *Environ. Pollut.* 60: 67-81.
- Pérez-López M., De la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Galeano J., Míguez-Santiyán M.P., de Castro-Lorenzo A., Soler F. (2016). Concentrations of metals, metalloids, and chlorinated pollutants in blood and plasma of white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings from Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 71: 313–321.
- Pérez-López M., Hermoso M.M., López Beceiro A., Soler-Rodríguez F. (2008). Heavy metal (Cd, Pb, Zn) and metalloid (As) content in raptor species from Galicia (NW Spain). *Ecotox. Environ. Saf.* 70: 154-162.
- Perkins M., Lane O.P., Evers D.C., Sauer A., Adams E.M., O'Driscoll N.J., Edmunds S.T., Jackson A.K., Hagelin J.C., Trimble J., Sunderland E.M. (2020). Historical patterns in mercury exposure for North American songbirds. *Ecotoxicology* 29(8): 1161-1173.
- Real Decreto 1406/1989, de 10 de noviembre, por el que se imponen limitaciones a la comercialización y al uso de ciertas sustancias y preparados peligrosos. (BOE 278 de 20/11/1989).



- Real Decreto 45/1996, de 19 de enero, por el que se regulan diversos aspectos relacionados con las pilas y los acumuladores que contengan determinadas materias peligrosas. [Disposición derogada por Real Decreto 106/2008] (BOE 48 de 24/02/1996).
- Real Decreto 785/2001, de 6 de julio, por el que se adelanta la prohibición de comercialización de las gasolinas con plomo y se establecen las especificaciones de las gasolinas que sustituirán a aquéllas. (BOE 162 de 7/07/2001).
- Real Decreto 106/2008, de 1 de febrero, sobre pilas y acumuladores y la gestión ambiental de sus residuos. (BOE 37 de 12/02/2008).
- Real Decreto 219/2013, de 22 de marzo, sobre restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas en aparatos eléctricos y electrónicos. (BOE 71 de 23/03/2013).
- Reglamento (CE) 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n° 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n° 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. (DOUE 396 de 30/12/2006).
- Reglamento (CE) 552/2009 de la Comisión, de 22 de junio de 2009, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH) en lo que respecta a su anexo XVII. (DOUE 164 de 26/06/2009).
- Reglamento de Ejecución (UE) 540/2011 de la Comisión, de 25 de mayo de 2011, por el que se aplica el Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas. (DOUE 153 de 11/06/2011).
- Reglamento (UE) 847/2012 de la Comisión, de 19 de septiembre de 2012, por el que se modifica, en lo que respecta al mercurio, el anexo XVII del Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH). (DOUE 253 de 20/09/2012).
- Reglamento (UE) 848/2012 de la Comisión, de 19 de septiembre de 2012, por el que se modifica, en lo que respecta a los compuestos de fenilmercurio, el anexo XVII del Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH). (DOUE 253 de 20/09/2012).
- Reglamento (UE) 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. (DOUE 167 de 27/06/2012).
- Reglamento (UE) 2017/852 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de mayo de 2017, sobre el mercurio y por el que se deroga el Reglamento (CE) n° 1102/2008. (DOUE 137 de 24/05/2017).
- Reif J.S. (2011). Animal sentinels for environmental and public health. *Public Health Rep.* 126 (Suppl 1): 50-57.
- Sánchez-Virosta P., Espín S., García-Fernández A.J., Eeva T. (2015). A review on exposure and effects of arsenic in passerine birds. *Sci. Total Environ.* 512: 506-525.



- Schütz A., Bergdahl A.I., Ekholm A., Skerfving S. (1996). Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls. *Occup. Environ. Med.* 53: 736-740.
- Tsipoura N., Burger J., Feltes R., Yacabucci J., Mizrahi D., Jeitner C., Gochfeld M. (2008). Metal concentrations in three species of passerine birds breeding in the Hackensack Meadowlands of New Jersey. *Environ. Res.* 107: 218-228.
- Van der Schalie W.H., Gardner Jr. H.S., Bantle J.A., De Rosa C.T., Finch R.A., Reif, J.S., Reuter R.H., Backer L.C., Burger J., Folmar L.C., Stokes W.S. (1999). Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environ. Health Persp.* 107(4): 309-315.
- Varela Z., García-Seoane R., Fernández J.A., Carballeira A., Aboal J.R. (2016). Study of temporal trends in mercury concentrations in the primary flight feathers of *Strix aluco*. *Ecotox Environ Saf.* 130: 199-206.
- Vizuete J., Pérez-López M., Míguez-Santiyán M.P, Hernández-Moreno D. (2019). Mercury (Hg), Lead (Pb), Cadmium (Cd), Selenium (Se), and Arsenic (As) in liver, kidney, and feathers of gulls: a review. *Rev Environ. Contam. Toxicol.* 247: 85-146.
- Wayland M., Alisauskas R.T., Kellett D., Traylor J., Swoboda C., Neugebauer E., Mehl K. (2007). Year-to-year correlations in blood metal levels among individuals of two species of North American sea ducks. *Environ. Pollut.* 150(3): 329-337.



CAPÍTULO IV

Parámetros bioquímicos sanguíneos en cigüeña blanca y su relación con la concentración de elementos metálicos en sangre.



RESUMEN

Para comprobar el estado sanitario en la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*), y su posible relación con la contaminación ambiental, es necesario ampliar el conocimiento sobre sus parámetros sanguíneos bioquímicos, especialmente en aves adultas, donde existen pocas referencias. En este trabajo se determinaron los valores de 20 parámetros plasmáticos bioquímicos en 139 ejemplares de cigüeña blanca muestreados en un Centro de Recuperación (juveniles o <1 año y adultas o >2 años) y en nidos en campo (pollos o <6 semanas), evaluando las diferencias relacionadas con la edad y el sexo. También se analizaron las concentraciones en sangre de Pb, Cd, Hg, Cu y As para estudiar sus posibles relaciones con los parámetros bioquímicos en los pollos de 3 colonias con diferentes niveles de contaminación metálica. En relación a la edad, prácticamente no hubo diferencias significativas en los parámetros bioquímicos entre juveniles y adultos. Los pollos mostraron valores significativamente más altos en LDH, CPK, ALP, K, P y ácidos biliares. Los de mayor edad mostraron valores superiores de AST, AChE, Ca, Mg, colesterol, proteínas totales y albumina; y no hubo diferencias por la edad en GGT, Cl, Na, glucosa, triglicéridos, ácido úrico y BUN. El sexo se pudo determinar en pollos, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los parámetros bioquímicos analizados. La colonia de cría de los pollos sí influyó significativamente en varios parámetros bioquímicos, pero no siguió un patrón general entre colonias. No se pudo establecer una relación clara, común y justificada entre los niveles de metales y As y los valores de los distintos parámetros bioquímicos, si bien se encontraron diversas correlaciones significativas dentro de cada colonia y, a nivel global, cuando se estudió el conjunto total de los pollos. Estos datos serán útiles para monitorear la exposición y concentraciones de elementos químicos, y su efecto sobre los parámetros bioquímicos, si bien es necesario ampliar este estudio a colonias en las que exista una clara contaminación ambiental por esos elementos, como pudieran ser colonias establecidas en zonas mineras.

ABSTRACT

To check the health status of the white stork (*Ciconia ciconia*), and its possible relationship with environmental contamination, it is necessary to expand the knowledge about its biochemical blood parameters, especially in adult birds, where there are few references. In this work, the values of 20 biochemical plasma parameters were determined in 139 specimens of white stork sampled in a Recovery Center (juveniles or <1 year and adults or >2 years) and in nests in the field (chicks or <6 weeks) evaluating the differences related to age and sex. Blood concentrations of Pb, Cd, Hg, Cu and As were also analyzed to study their possible relationships with biochemical parameters in chicks from 3 colonies with different levels of metallic contamination. In relation to age, there were practically no significant differences in the biochemical parameters between juveniles and adults. Chicks showed significantly higher values in LDH, CPK, ALP, K, P and bile acids. The older ones showed higher values of AST, AChE, Ca, Mg, cholesterol, total proteins and albumin; and there were no differences by age in GGT, Cl, Na, glucose, triglycerides, uric acid and BUN. The sex could be determined in white stork chicks, not finding significant differences in any of the biochemical parameters analyzed.



The breeding colony of the chicks significantly influenced several biochemical parameters but did not follow a general pattern among colonies. A clear, common, and justified relationship between metal and As levels and the values of the different biochemical parameters could not be established, although several significant correlations were found within each colony and, globally, when the total set of chicks was studied. This data will be useful for monitoring the exposure and concentrations of chemical elements, and their effect on biochemical parameters, although it is necessary to extend this study to colonies where there is clear environmental pollution by these elements, such as colonies established in mining areas.

IV. 1. INTRODUCCIÓN

Las concentraciones de contaminantes en sangre por sí solas pueden no proporcionar suficiente información sobre el estrés biológico causado en los animales (Geens *et al.*, 2010), por lo que su estudio combinado con biomarcadores bioquímicos sanguíneos ha permitido evaluar e identificar los efectos adversos de esos contaminantes ambientales en la salud de varias aves silvestres (Barata *et al.*, 2010; Fossi, 1994). Tras la exposición y absorción de los contaminantes, la sangre los transporta y distribuye en el organismo, lo que hace de la sangre una muestra útil y adecuada para el cribado de contaminantes en vertebrados (Maceda-Veiga *et al.*, 2015). La sangre de cigüeñas blancas se ha utilizado en diversos estudios de contaminación ambiental (Baos *et al.*, 2006; Benito *et al.*, 1999; Cabo *et al.*, 2012; de la Casa-Resino *et al.*, 2014a, b, 2015; Kamiński *et al.*, 2007; Kamiński *et al.*, 2008; Maia *et al.*, 2017; Meharg *et al.*, 2002; Pérez-López *et al.*, 2016; Álvarez *et al.*, 2013). Las publicaciones sobre parámetros hematológicos y bioquímicos de especies de aves domésticas son abundantes (Campbell, 2012; Harr, 2002; Mostaghni *et al.*, 2005), si bien en especies de aves silvestres no están tan bien documentados (Alonso *et al.*, 1991; Mostaghni *et al.*, 2005; Muriel *et al.*, 2013). Además de las diferencias entre distintas especies de aves, es importante estudiar las diferencias debidas a distintas condiciones fisiológicas como los ritmos circadianos y estacionales, la edad, el sexo, condición corporal o el estado reproductivo (Beeby, 2001; Norte *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2016; Muriel *et al.*, 2013). En la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*), especie monomórfica donde el tamaño y las características morfológicas externas son similares entre machos y hembras, se conoce muy poco acerca de cómo los parámetros bioquímicos difieren con el sexo (Jerzak *et al.*, 2010; Kaminski *et al.*, 2014). Los datos sobre estas variaciones naturales pueden ser muy útiles, ya que los parámetros bioquímicos plasmáticos individuales monitorizan indirectamente el estado de salud general del ave y pueden sufrir variaciones debidas a la exposición a algunos contaminantes (Han *et al.*, 2016; Stout *et al.*, 2010), por lo que algunos propios parámetros bioquímicos pueden utilizarse como biomarcadores de exposición y efecto a contaminantes (Barata *et al.* 2010; Sonne *et al.*, 2012). De hecho, el uso combinado de análisis químico y biomarcadores ha permitido evaluar e identificar efectos adversos de contaminantes (Barata *et al.* 2010; Cordi *et al.*, 1997; Fossi *et al.*, 1994; Marteinson *et al.*, 2017; Sonne *et al.*, 2012), e incluso el uso de técnicas no letales como el uso de biomarcadores en sangre y de contaminantes en sangre, plumas o huevos se han aplicado en el estudio de especies catalogadas



como en peligro (Champoux *et al.*, 2006; Franson *et al.*, 2002; Quirós *et al.*, 2008; Vos *et al.*, 2000).

Algunos metales y metaloides se consideran esenciales para las aves porque su concentración en el animal suele ser constante y su deficiencia en el organismo conduce a anomalías (fisiológicas u otras) (Benito *et al.*, 1999; Orłowski *et al.*, 2012), como es el caso del Cu. Sin embargo, en exposiciones prolongadas o en exposición a altas dosis, los elementos esenciales pueden revelar toxicidad (Levengood y Beasley, 2007; Liu *et al.*, 2010). Otras sustancias inorgánicas, como Pb, Cd, el Hg y el As se consideran tóxicas ya que no tienen una función biológica conocida y pueden provocar una amplia gama de efectos adversos a bajas concentraciones (Carneiro *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2010; Serrato *et al.*, 2010).

En la biomonitorización de estos contaminantes inorgánicos se han utilizado ejemplares jóvenes (pollos) en lugar de adultos con el objetivo de minimizar el efecto de su bioacumulación, que se espera sea más evidente en adultos (Berglund *et al.*, 2010; Furness *et al.*, 1993). Estos hechos, y muchas veces la dificultad de tomar muestras de sangre en cigüeñas blancas adultas, se reflejan en la bibliografía donde existe muy poca información sobre parámetros bioquímicos en cigüeña blanca adulta silvestre, ya que solamente hemos encontrado dos estudios, el de Alonso *et al.* (1991) y el de Szabó *et al.* (2010). Debido a esto, nos propusimos investigar las diferencias relacionadas con la edad y el sexo en los parámetros bioquímicos plasmáticos de *Ciconia ciconia*. Además, y dado que hay autores que refieren una relación entre los parámetros bioquímicos y el nivel de metales en sangre (Barata *et al.*, 2010; Hochleithner, 1994; Hoffman *et al.*, 2005; Lee y Jacobs, 2009), se decidió estudiar esta posible relación en las muestras tomadas. Por tanto, el presente trabajo tiene como objetivos: (1) proporcionar información básica sobre la bioquímica plasmática de la cigüeña blanca, comparando los resultados con valores publicados, (2) estudiar el efecto del sexo y de la edad sobre esos parámetros bioquímicos, y (3) investigar la posible relación entre los valores bioquímicos plasmáticos obtenidos y las concentraciones sanguíneas de metales (Pb, Cd, Hg, Cu) y el metaloide As como reflejo de la contaminación por metales del hábitat circundante en las colonias.

IV.2. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.2.1. Puntos de muestreo

El muestreo de un total de 139 ejemplares de cigüeñas blancas se desarrolló en dos fases diferentes: la primera en el Centro de recuperación de fauna (toma de muestras de adultos y juveniles) y la segunda en tres colonias distintas situadas en la provincia de Cáceres (toma de muestras de pollos). Para ello se contó con los correspondientes permisos y autorizaciones de la Comisión de Bioética de la Universidad Extremadura y de la Dirección General del Medio Natural de la Junta de Extremadura.

En la primera fase, se muestrearon ejemplares adultos (pico y patas de color rojizo intenso, con más de 2 años de edad, $n = 18$) y juveniles (pico de color gris-marrón o rojo sucio y patas rosadas, edad menor a 1 año, $n = 18$) que se encontraban en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre y Educación ambiental “Los Hornos”, en Sierra de Fuentes (Cáceres).



En la fase de campo, los pollos (en nido, pico negro, entre 3 a 6 semanas de edad, n = 121) fueron muestreados en años consecutivos (de 2009 a 2011) en las tres colonias de la provincia de Cáceres que están referidas en el Capítulo II: una colonia en la Zona de Especial Protección para las Aves según la Directiva Europea (colonia Z); otra bajo la influencia de una zona ganadera, de agricultura intensiva y cercana a un vertedero (colonia AG); y una tercera en una zona ganadera, de pastizal, y adyacente a una carretera nacional colonia (C).

IV.2.2. Muestreo de sangre y muestras recogidas

El muestreo de sangre fue realizado siguiendo la metodología descrita en el Capítulo I para los ejemplares del centro de recuperación, y de acuerdo a lo descrito en el Capítulo II para los pollos de las tres colonias.

Para cada animal muestreado, de la sangre completa heparinizada extraída se hicieron tres alícuotas: una que se transfirió a crioviales de 1,5 ml lavados previamente con HNO₃ al 2 % para el análisis elemental, una gota de sangre se transfirió a un tubo Eppendorf® con alcohol para la identificación del sexo del animal, y una tercera alícuota se transfirió a un tubo de 2,5 ml para la obtención de plasma. Cada alícuota se etiquetó adecuadamente y se transportó refrigerada al laboratorio. La alícuota en tubo de 2,5 mL se centrifugó (3500 rpm durante 10 minutos) a la llegada al laboratorio y el plasma resultante se conservó en un criovial de 1,5 ml para los análisis bioquímicos. Todas las muestras se conservaron a -80 °C hasta que se efectuaron los correspondientes análisis.

IV.2.3. Análisis bioquímico

Las muestras de plasma se descongelaron y las que presentaban hemólisis y/o lipemias visibles se retiraron del análisis posterior. Se determinaron los 20 siguientes parámetros bioquímicos plasmáticos: enzimas [aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP), creatina quinasa (CPK), actividad lactato deshidrogenasa (LDH), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), acetilcolinesterasa (AChE)], proteínas totales (PT), albúmina, glucosa, colesterol, triglicéridos, urea en sangre (BUN), ácido úrico, ácidos biliares, electrolitos [sodio (Na), potasio (K), cloruro (Cl)] y minerales [calcio total (Ca), magnesio (Mg), fósforo (P)].

La actividad de la enzima AChE fue determinada en plasma según el método propuesto por Hill y Fleming (1982), en un espectrofotómetro Hitachi® UV-1603 con controlador de temperatura CPS 240, en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres. El sustrato (yoduro de acetiltiocolina) y el cromóforo (ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) o DTNB) fueron suministrados por Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Ácido fosfórico 85 %, etanol absoluto, fosfato dipotásico y fosfato de potasio monobásico fueron proporcionados por Panreac S.A., España.

Los restantes análisis se realizaron con los siguientes aparatos: un equipo *Clima Plus*® para el ácido úrico, AST, CPK, GGT y LDH utilizando reactivos comerciales de los laboratorios RAL; un analizador automático *Saturno 100 VetCrony Instruments*® para PT, BUN, albúmina, ácidos biliares, Ca, P, Mg, glucosa, colesterol y triglicéridos, utilizando reactivos de *Spinreact*®; y un equipo *Easy Electrolytes Medicat*® para los electrolitos (Na, Cl, K). Estos análisis se realizaron



en el Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura (Cáceres).

IV.2.4. Determinación del sexo

En la determinación del sexo se aplicó la técnica de PCR descrita por Griffiths *et al.* (1996) como está detallado en el Capítulo I. Esta determinación se realizó con éxito en 79 ejemplares (40 machos y 39 hembras) de los que únicamente 3 machos y 5 hembras fueron adultas, por lo que el estudio de la influencia del sexo sobre los distintos parámetros bioquímicos se centró solo en el grupo de los pollos del estudio de campo.

IV.2.5. Determinación de elementos químicos en sangre por ICP-MS

El análisis se realizó en el Laboratorio de Análisis Elemental y Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAIUEX, acreditado por la ISO 9001: 2008) de la Universidad de Extremadura. Una descripción detallada de las condiciones y toda la metodología se encuentra en el Capítulo I, apartado I.2.2. *Determinación de elementos en sangre*. El límite de detección (LD) de los elementos en la sangre fue 3,46 µg/L para Cu, 0,25 µg/L para Cd, 0,21 µg/L para Pb, 3,01 µg/L para Hg y 0,50 µg/L para As. Con fines estadísticos, a cada muestra de sangre por debajo del LD, se asignó un valor de la mitad del límite de detección y se incluyó en el conjunto de datos.

IV.2.6. Análisis estadístico

Para analizar los datos se utilizó el software estadístico Prism 6, versión para Windows (*GraphPad software, Inc., CA*). Se calcularon la media, la desviación estándar (DE), el rango (valores mínimo y máximo) y la mediana para cada parámetro bioquímico y contaminante estudiado. En cada grupo de datos se aplicó la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson y la mayoría de ellos (33 de 36) no se distribuyeron normalmente. Incluso después de la transformación logarítmica de los datos, $y = \log(y)$, no todas las variables mostraron una distribución normal, y los supuestos de las pruebas de normalidad no se cumplieron, por lo que se decidió la utilización de pruebas no paramétricas. Se aplicó: la prueba de Mann-Whitney para comparar valores entre dos grupos: machos (n = 40) vs hembras (n = 39); la prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis seguida de la prueba *post-hoc* de Dunn para comparar los valores de parámetros bioquímicos y de metales entre los tres grupos de edad (pollos, n=103; juveniles, n=18 y adultos, n=18); y entre las tres colonias de pollos AG (n = 34), C (n = 34), Z (n = 35). Con los datos obtenidos de los pollos de cada colonia, y con el total de los mismos, se realizó un estudio de correlación de rangos de Spearman para evaluar la correlación entre los diferentes elementos químicos en la sangre y los valores de los parámetros bioquímicos plasmáticos. La significación estadística se estableció en todos los casos en $p < 0,05$.

IV. 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1. Parámetros bioquímicos



Los análisis de sangre tienen un gran potencial en los estudios de ecología, ecotoxicología y veterinaria en vertebrados salvajes basados en los avances en la medicina humana y animal doméstico. Sin embargo, hay que tener siempre en cuenta que las directrices para la hematología humana o de animales domésticos no siempre se aplican a la vida silvestre. Además de la practicidad y relevancia ecológica de las variables sanguíneas simples, se ha demostrado la idoneidad de las muestras de sangre para la aplicación de procedimientos analíticos de vanguardia para ampliar el repertorio actual de herramientas de diagnóstico en la monitorización de la vida silvestre y la evaluación de la salud de los ecosistemas (Maceda-Veiga *et al.*, 2015).

Los valores medios globales obtenidos para muchos de los parámetros fueron similares a los descritos por otros autores para cigüeñas blancas adultas y jóvenes (Alonso *et al.*, 1991; Batista, 2012; Jerzak *et al.*, 2010; Montesinos *et al.*, 1997; Szabó *et al.*, 2010) y otras especies del mismo género (Han *et al.* 2016; Puerta *et al.*, 1989), excepto para el Cl, ya que no se encontraron valores de referencia para la cigüeña blanca en la literatura, siendo nuestro trabajo el primero en establecerlos.

IV.3.2. Influencia del sexo

La influencia del sexo se determinó entre los valores obtenidos de 33 pollos hembra y 37 machos del estudio de campo en los que fue posible la diferenciación por sexos, descartando los ejemplares adultos debido al muy escaso número de ejemplares en los que no se pudo determinar el sexo al obtener resultados no concluyentes. Los valores medios de los parámetros bioquímicos analizados fueron similares entre sexos, no obteniendo diferencias significativas en ningún caso. Solamente encontramos referencias bibliográficas de diferencias relacionadas con el sexo en pollos de cigüeña blanca en el estudio de Jerzak *et al.* (2010), donde se describió que el colesterol, AST, proteínas y ácido úrico era mayor en las hembras que en los machos. Sin embargo, en la especie del mismo género, *Ciconia boycana*, Han *et al.* (2016) compararon los niveles de PT, albúmina, AST, ALT, creatinina, triglicéridos, bilirrubina total y K entre dos grupos de edad (aves menores de 1 año y mayores de 1 año) y no encontraron diferencias relacionadas con el sexo. Lanzarot *et al.* (2005) en la cigüeña negra (*Ciconia nigra*), encontraron en los machos niveles más elevados de albúmina y en hembras niveles más altos de PT, ALP y triglicéridos.

IV.3.3. Influencia de la edad

En la **Tabla 31** (actividades enzimáticas), la **Tabla 33** (electrolitos y minerales) y la **Tabla 35** (parámetros metabólicos y otros) se recogen los estadísticos descriptivos de los distintos parámetros bioquímicos plasmáticos obtenidos de forma global y en los diferentes grupos de edad (adultos y juveniles muestreados en el Centro de Recuperación y pollos en el estudio de campo). En las **Tablas 32, 34 y 36** se recoge el estudio estadístico aplicado en cada uno de estos grupos de parámetros para poner en evidencia los posibles cambios debidos a la edad de los ejemplares muestreados.



Tabla 31. Tamaño muestral (n) y estadística descriptiva (media \pm desviación estándar y rango) para la actividad de las enzimas plasmáticas.

	GLOBAL			POLLOS			JUVENILES			ADULTOS		
	n	Media \pm DE (UI/L)	Rango (UI/L)	n	Media \pm DE (UI/L)	Rango (UI/L)	n	Media \pm DE (UI/L)	Rango (UI/L)	n	Media \pm DE (UI/L)	Rango (UI/L)
AST	139	258,1 \pm 199,3	90-1840	103	226,6 \pm 181,9	90-1840	18	329,4 \pm 234,6	130-1120	18	367,2 \pm 212,1	120-840
GGT	138	28,09 \pm 21,6	1,0-81	102	28,42 \pm 21,90	1-76	18	21,1 \pm 17,3	6,0-75,0	14	33,22 \pm 22,98	3-81
LDH	139	1150 \pm 532,9	40-3894	103	1207 \pm 387,8	40-3894	18	1236 \pm 444	603-2121	17	773,2 \pm 448,8	80-1700
CPK	138	633,8 \pm 472,9	30-2970	102	772,1 \pm 387,8	190-2160	18	340,6 \pm 662,7	50-2970	18	143,3 \pm 94,9	30-400
ALP	139	925,1 \pm 508,8	60-2040	103	1143 \pm 390,6	129-2040	18	413,8 \pm 158,0	120-720	18	191,1 \pm 164,4	60-650
AChE	137	1441 \pm 408,5	675-2589	102	1394 \pm 390,1	675-2589	17	1419 \pm 426,4	746-2497	18	1733 \pm 395	1020-2387

Tabla 32. Estudio estadístico multivariante sobre el efecto de la edad en las enzimas plasmáticas.

	Kruskal-Wallis test (valor de p)	Test de comparación múltiple de Dunn		
		Adultos-Juveniles	Adultos-Pollos	Juveniles-Pollos
AST	0,0001 (***)	ns	**	**
GGT	0,2282	ns	ns	ns
LDH	0,0017 (**)	*	**	ns
CPK	<0,0001 (***)	ns	***	***
ALP	<0,0001 (***)	ns	***	***
AChE	0,0078 (**)	ns	**	ns



Tabla 33. Tamaño muestral (n) y estadística descriptiva (media \pm desviación estándar y rango) para los electrolitos y minerales. Datos en mmol/L.

	GLOBAL			POLLOS			JUVENILES (<1año)			ADULTOS (>2 años)		
	n	Media \pm DE	Rango	n	Media \pm DE	Rango	n	Media \pm DE	Rango	n	Media \pm DE	Rango
Cl	127	117,3 \pm 12,18	93-219,8	100	116,3 \pm 8,90	93,0-143,1	13	117,4 \pm 2,89	111,1-121,2	14	124,4 \pm 27,65	111,3-219,8
Na	137	146,1 \pm 9,7	102,6-176	102	146,2 \pm 8,92	111-176	18	145,3 \pm 11,87	109,1-172,6	17	146,3 \pm 12,06	102,6-155,5
K	135	3,48 \pm 1,01	1,15-6,86	99	3,65 \pm 1,04	2,28-6,86	18	3,04 \pm 1,01	1,15-5,03	18	3,01 \pm 0,55	2,05-3,86
Mg	139	1,13 \pm 0,38	0,12-3,13	103	1,09 \pm 0,45	0,00-3,13	18	1,13 \pm 0,16	0,78-1,52	18	1,26 \pm 0,16	1,03-1,6
Ca	139	2,53 \pm 0,21	1,65-3,48	103	2,50 \pm 0,19	2,00-3,48	18	2,63 \pm 0,15	2,28-2,91	18	2,62 \pm 0,32	1,65-2,93
P	138	1,64 \pm 0,59	0,45-4,1	102	1,78 \pm 0,59	0,74-4,10	18	1,41 \pm 0,24	0,94-1,87	18	1,04 \pm 0,35	0,45-1,62

Tabla 34. Estudio estadístico multivariante sobre el efecto de la edad sobre los electrolitos y minerales plasmáticos.

	Kruskal-Wallis test (valor de p)	Test de comparación múltiple de Dunn		
		Adultos-Juveniles	Adultos-Pollos	Juveniles-Pollos
Cl	0,0477 (*)	ns	ns	ns
Na	0,1003	ns	ns	ns
K	0,0044 (**)	ns	*	ns
Mg	0,0416 (*)	ns	*	ns
Ca	<0,0001 (***)	ns	***	**
P	<0,0001 (***)	ns	***	ns



Tabla 35. Tamaño muestral (n) y estadística descriptiva (media \pm desviación estándar y rango) para los metabolitos y otros parámetros del plasma.
(a)=mmol/L; (b)=g/L y (c)= μ mol/L

	GLOBAL			POLLOS			JUVENILES (<1año)			ADULTOS (>2 años)		
	n	Media \pm DE	Rango	n	Media \pm DE	Rango	n	Media \pm DE	Rango	n	Media \pm DE	Rango
Glucosa (a)	139	15,18 \pm 1,99	9,99-22,53	103	15,35 \pm 2,04	9,99-22,53	18	14,34 \pm 1,80	10,94-17,43	18	15,09 \pm 1,66	12,77-19,04
Colesterol (a)	139	4,34 \pm 1,32	1,94-9,89	103	3,79 \pm 0,71	1,94-5,91	18	5,87 \pm 1,72	4,09-9,89	18	5,99 \pm 0,96	4,97-8,38
Triglicér. (a)	139	2,18 \pm 11,08	0,07-131	103	1,38 \pm 1,47	0,07-12,8	18	0,93 \pm 0,38	0,47-2,00	18	0,83 \pm 0,33	0,3-1,65
Proteína T (b)	138	36,71 \pm 13,20	16,0-119	102	32,40 \pm 13,47	16,0-119	18	46,56 \pm 9,59	36-80	18	47,16 \pm 6,59	36-61
Albumina (b)	137	19,33 \pm 3,701	9,8-33	101	18,03 \pm 2,77	9,80-33,0	18	23,37 \pm 2,95	19,0-28,9	18	22,61 \pm 4,14	12,3-28,9
Á. biliares (c)	137	14,14 \pm 12,43	0,4-57,6	102	16,81 \pm 12,91	1,00-57,60	18	4,00 \pm 2,49	0,40-9,70	17	8,90 \pm 8,04	0,7-27,3
Á. úrico (c)	139	392 \pm 198,2	65,44-1208	103	417,2 \pm 206,6	65,4-1208	18	337,8 \pm 162,4	148,8-749,7	18	302,5 \pm 144,8	101,2-577,2
BUN (a)	138	2,02 \pm 1,95	0,12-12,22	102	1,94 \pm 1,69	0,12-10,42	18	2,8 \pm 2,82	0,36-12,22	18	2,32 \pm 2,36	0,53-9,07

**Tabla 36. Estudio estadístico multivariante sobre el efecto de la edad en metabolitos y otros parámetros plasmáticos.**

	Kruskal-Wallis test (valor de P)	Test de comparación múltiple de Dunn		
		Adultos- Juveniles	Adultos- Pollos	Juveniles- Pollos
Glucosa	0,1297	ns	ns	ns
Colesterol	<0,0001 (***)	ns	***	***
Triglicéridos	0,2573	ns	ns	ns
Proteínas T.	<0,0001 (***)	ns	***	***
Albúmina	<0,0001 (***)	ns	***	***
Ácidos biliares	<0,0001 (***)	ns	*	***
Ácido úrico	0,0347 (*)	ns	ns	ns
BUN	0,7625	ns	ns	ns

En nuestro estudio, del total de 20 parámetros, se encontraron diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la edad en la mayoría de los parámetros bioquímicos plasmáticos, salvo en GGT, Cl⁻, Na, glucosa, triglicéridos, ácido úrico y urea. Jerzak *et al.* (2010) estudiando 9 parámetros bioquímicos en pollos de cigüeña blanca de distintas edades únicamente encontraron diferencias significativas en triglicéridos y AST.

IV.3.4. Enzimas

Los resultados del estudio estadístico descriptivo de forma global y diferenciado por edades aparecen en la **Tabla 31**; y el estudio estadístico de comparación entre grupos de edad se recoge en la **Tabla 32**.

Atendiendo a los grupos por edades hay que destacar que hemos encontrado un incremento apreciable y directo para las actividades enzimática AST y AChE, mientras que se observa una tendencia progresiva a la disminución en el caso de la LDH, CPK y ALP. La GGT fue la única enzima que no mostró variación dependiente de la edad.

La actividad de las enzimas plasmáticas se utiliza como herramienta de diagnóstico del estado de salud (Jerzak *et al.*, 2010), ya que cualquier aumento en la actividad de enzimas plasmáticas específicas puede indicar daño tisular (Maceda-Veiga *et al.*, 2015). Algunas enzimas son más sensibles y/o específicas de un órgano o tejido. En las aves, la LDH y la AST se pueden encontrar por lo general en muchos tejidos diferentes. La AST se encuentra sobre todo en el tejido hepático y muscular, y las elevaciones de ALP están asociadas con la actividad osteoblástica o la enfermedad ósea (Doneley, 2007). La CPK es específica del tejido muscular. La evaluación de las elevaciones de AST y LDH debe realizarse junto con los niveles de CPK, ya que generalmente las actividades aumentadas de LDH y AST con una CPK normal suelen ser indicativo de enfermedad hepática,



teniendo en cuenta que la LDH tiene una vida media más corta que la AST y una vida media mayor que CPK (Doneley, 2007; Lumeij, 2008). Si bien se ha indicado (Campbell, 2012) que las actividades de AST en aves superiores a 275 UI/L pueden ser consideradas como de un incremento anormal, un valor medio de 267 UI/L con un rango normal de 54-569 UI/L ha sido encontrado en cigüeñas blancas adultas (Szabó *et al.*, 2010), siendo muy similar al valor medio global encontrado por nosotros (258,1 UI/L), y los niveles medios de AST por grupos de edades en el presente estudio fueron similares a los indicados previamente en cigüeña blanca (Blázquez *et al.*, 2006; Montesinos *et al.*, 1997; Szabó *et al.*, 2010). Al igual que nosotros, otros autores encontraron una elevación significativa con la edad (Batista *et al.*, 2012; Lanzarot *et al.*, 2005), si bien se citan incluso disminución (Montesinos *et al.*, 1997), aunque en estos casos se comparaban grupos de pollos con edad creciente (desde <12 días a 56 días), no animales juveniles independientes ni adultos.

La actividad de LDH mostró un amplio rango de valores de actividad en todos los grupos, lo que es habitual en esta enzima (Campbell, 2012). Los valores medios de LDH en pollos y juveniles estaban cerca de los niveles encontrados por Han *et al.* (2016) en *Ciconia boycana* de edad > 1 año, por Lanzarot *et al.* (2005) en pollos de *Ciconia nigra* (media de 1062,94±317,37 UI/L) y por Batista (2012) en pollos (20-70 días) de Portugal. Nuestros datos en adultos fueron similares al valor y rango descritos por Szabó *et al.* (2010) en cigüeña blanca adulta (media: 880 UI/L, rango de 300 a 1626 UI/L).

En la enzima CPK, observamos un amplio rango de valores en cigüeñas blancas jóvenes comparando con las adultas, siendo el valor medio en los juveniles más del doble del de los adultos, y en los pollos más de 5 veces que los adultos. Para explicar estas diferencias se debe tener en cuenta, más que el factor de la edad, el cuidado tomado para recolectar las muestras y el temperamento de los animales, ya que aves jóvenes (sobre todo de colonias silvestres) que tienen que ser capturadas desde los nidos hasta el suelo para ser observadas y muestreadas, van a sufrir un evento más estresante y propenso a causar algún daño muscular que la recogida de adultos, que probablemente estén más habituados a la presencia humana. Hemos observado una tendencia progresiva a la disminución de los valores medios con la edad, lo que no encontramos en la bibliografía donde se encuentran valores en pollos de cigüeña negra desde 828,72±456,42 UI/L (Lanzarot *et al.*, 2005) e incluso de; 259±80,4 UI/L en pollos de 44-56 días de cigüeña blanca (Montesinos *et al.*, 1997).

La ALP de aves se encuentra en varios tejidos, incluyendo los huesos y el intestino. Los aumentos en su actividad plasmática son el resultado de una mayor producción celular en las aves y generalmente están relacionados con la actividad osteoblástica o la enfermedad ósea (Campbell, 2012). La mayor actividad de ALP encontrada en los grupos más jóvenes (y que disminuye progresivamente con la edad) puede explicarse debido a la mayor actividad osteoblástica de las aves más jóvenes, compatible con su crecimiento corporal (Polo *et al.*, 1994). La disminución con la edad en los niveles de ALP es común y fue observada por otros autores en varias ciconiformes (Batista, 2012; Han *et al.*, 2016; Polo *et al.*, 1994).



En las aves, la actividad de GGT no es específica de los tejidos hepáticos y aparece en el cerebro, los intestinos y los riñones. De manera similar a lo que sucede con la ALP, la elevación de la actividad plasmática de GGT no está relacionada con su salida de las células por alteración de las mismas, sino por un aumento en su producción (Campbell, 2012). Nuestros niveles medios globales observados de GGT (UI/L) ($28,09 \pm 21,6$) fueron similares a los de Batista et al. (2012) y menores que los de Szabó et al. (2010). La GGT fue la única enzima donde encontramos niveles similares entre adultos y aves jóvenes, al igual que lo descrito por Batista (2012).

IV.3.5. Electrolitos y minerales

Para el mantenimiento de la osmolaridad plasmática, el Cl, Na y K son los electrolitos más importantes (Kerr, 2002). No hemos encontrado referencias de niveles de Cl en cigüeña blanca, siendo los obtenidos en nuestro trabajo los descritos por primera vez, si bien en otra ciconiforme, la *Ciconia bocyana*, los niveles de Cl (118 ± 4 y 116 ± 6 mmol/L en ejemplares < 1 año y > 1 año, respectivamente) fueron similares (Han et al., 2016). No encontramos diferencias en los niveles de Cl entre grupos de edad, lo mismo que ocurrió en el caso del Na. Las concentraciones de Na estaban en el rango de 102,6-176 mmol/L, algo más amplio que el indicado por Jenkins (1994) como rango normal para las aves (130-155 mmol/L). Los niveles de Na fueron muy ligeramente inferiores a los reportados por Han et al. (2016), quienes no encuentran diferencias en función de la edad (155 ± 5 mmol/L en < 1 año y 152 ± 5 mmol/L en > 1 año). Los niveles de K fueron significativamente más altos en los adultos que en los pollos, y si bien el valor medio (3,48 mmol/L) estaba por debajo de 4 mmol/L que se menciona como un umbral para la hiperpotasemia en la mayoría de las aves (Campbell, 2012), en el caso de los ejemplares juveniles y pollos existieron ejemplares que superaron ese umbral. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Han et al. (2016) en *Ciconia bocyana* que encuentran diferencias significativas con la edad, de $3,4 \pm 0,8$ mmol/L en < 1 año y $4,0 \pm 1,4$ mmol/L en > 1 año).

Las concentraciones de Ca y P en la dieta deben ser las adecuadas para que los animales mantengan el equilibrio de estos minerales (Kerr, 2002), siendo el Mg y el Ca componentes básicos de los tejidos, órganos y esqueleto de las aves (Orlowski et al. 2012). Mg y P mostraron niveles más altos en pollos con respecto a los adultos y, además, fueron estadísticamente significativos. Lo contrario se observó en el caso del Ca, donde los niveles más bajos de Ca plasmático se encontraron en las aves más jóvenes (pollos), lo que puede explicarse por la necesidad y movilización de calcio para la formación del esqueleto, reduciendo las concentraciones de Ca plasmático (Batista, 2012). Han et al. (2016) en *Ciconia bocyana* no encontraron diferencias significativas en los niveles de Ca y P entre aves menores y mayores de 1 año, lo que se asemeja a lo ocurrido en nuestro estudio entre juveniles (< 1 año) y adultos (> 2 años)

IV.3.6. Metabolitos y otros parámetros plasmáticos

Los resultados del estudio estadístico descriptivo de forma global y diferenciado por edades respecto a los metabolitos y otros parámetros plasmáticos aparecen en la **Tabla**



35; y el estudio inferencial de comparación entre grupos de edad se recoge en la **Tabla 36**.

Las aves sanas pueden tener niveles de glucosa superiores a 25 mmol/L (Harr, 2002; Mostaghni *et al.*, 2005) y, según Lumeij (2008), los valores del rango de referencia de las aves para la glucosa plasmática oscilan entre 11 y 25 mmol/L. En nuestro estudio encontramos un rango similar (9,99-22,53 mmol/L) y fueron similares entre todos los grupos estudiados.

Los metabolitos de las proteínas plasmáticas (urea, ácido úrico) y los metabolitos de las grasas (triglicéridos, colesterol) se han relacionado con el estado fisiológico o patológico del ave (Doneley, 2007; Jerzak *et al.*, 2010).

Los valores globales de PT fueron similares a los encontrados por otros autores (Alonso *et al.*, 1991; Batista, 2012; Puerta *et al.*, 1989; Szabó *et al.*, 2010), si bien los valores globales de albúmina y PT fueron superiores a los observados por Montesinos *et al.* (1997). El rango de PT en juveniles y adultos (36-80 g/L) se encuentra dentro del intervalo referido por Campbell (2012) para las aves en general (10-100 g/L), mientras que algunos pollos mostraron unas concentraciones mayores (hasta 119 g/L). La albúmina mostró la misma tendencia que las PT, siendo los valores en pollos significativamente menores que en juveniles y adultos, lo que también ha sido descrito en cigüeña blanca por Batista (2012). Los valores globales de albúmina fueron algo superiores a los señalados en general para aves por Campbell (2012).

El valor medio de colesterol en los pollos fue significativamente menor que en los juveniles y adultos, y no fue muy lejano del descrito por Puerta *et al.* (1989) y Montesinos *et al.* (1987), siendo menor que el reportado por Blazquez *et al.* (2006). El valor medio de colesterol en adultos y juveniles se asemejan a los descritos para los adultos de *Ciconia nigra* y *C. bocyana* (Han *et al.*, 2016; Lanzarot *et al.*, 2005). Campbell (2012) indica para las aves en general, niveles de colesterol que oscilan entre 2,59 y 6,47 mmol/L, si bien en nuestro estudio este rango ha sido mayor (1,94-9,89 mmol/L). En los triglicéridos nos encontramos con una situación inversa a lo acontecido en el colesterol ya que con la edad sus niveles fueron decreciendo, si bien las diferencias en los niveles de triglicéridos entre los grupos de edad no fueron significativas. El valor medio global triglicéridos fue aproximado al indicado por Blazquez *et al.* (2006), inferior al de Alonso *et al.* (1991) y superior a Batista (2012), Puerta *et al.* (1989) y Montesinos *et al.* (1997). Los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos están influenciados por la dieta y el ayuno (Batista *et al.*, 2012). En nuestro estudio la dieta de los adultos y los juveniles estuvo muy controlada y conocida (basado en carne de pollo de gallina) al ser suministrada en el Centro de Recuperación, por lo que es normal la ausencia de diferencias entre estos dos grupos de edad; sin embargo, la dieta de los pollos en las tres colonias era desconocida, por lo que sería interesante realizar estudios para profundizar en ella antes de sacar conclusiones.

En las aves, el ácido úrico en sangre es el principal producto nitrogenado y la urea no tiene la importancia clínica en comparación con los mamíferos (Campbell, 2012; Harr,



2002). Los niveles medios de ácido úrico ($392 \pm 198,2 \mu\text{mol/L}$) estuvieron por debajo de $750 \mu\text{mol/L}$, umbral por encima de que existe un deterioro de la función renal, y que puede tener múltiples causas entre las que se incluyen nefrotoxinas como el Pb (Campbell, 2012). Los niveles de ácido úrico no mostraron diferencias significativas entre grupos, si bien fueron más altos en los pollos, similar a lo que indicado por Batista *et al.* (2012) en cigüeña blanca donde el ácido úrico disminuyó con la edad. Sin embargo, Campbell (2012) refirió que el ácido úrico tiende a ser mayor en adultos.

Los valores de urea fueron similares entre pollos, juveniles y adultas. La urea en las aves se puede utilizar para acceder a la homeostasis electrolítica junto con el ácido úrico, el PT y el Na (Sonne *et al.*, 2012).

En algunas especies de aves, la determinación de ácidos biliares es una prueba sensible para la función hepática (Campbell, 2012). El nivel medio global de ácidos biliares ($14,14 \pm 12,43 \mu\text{mol/L}$) fue menor al descrito por Blazquez *et al.* (2006) y superior a Batista (2012) y Lanzarot *et al.* (2005). Se recomienda un ayuno de 12h antes de la recogida de sangre para evaluar los ácidos biliares (Campbell, 2012), pero en este estudio no pudimos aplicar esta recomendación en el muestreo de las colonias, lo cual pudo ser un factor que explique los niveles más altos en pollos (de las colonias) cuando se compara con los resultados en juveniles y adultos del Centro de Recuperación.

IV.3.7. Relación entre elementos químicos y parámetros plasmáticos

Este estudio se realizó entre los pollos de las 3 colonias de muestreo, de los que se analizaron los elementos químicos. Entre estos tres grupos no se encontraron diferencias significativas debidas a la edad (en semanas), el peso y el índice de condición corporal de los pollos.

Para cada colonia, los niveles de elementos químicos en sangre se encuentran en la **Figura 11** y los de los distintos parámetros plasmáticos en la **Tabla 37**, comprobando que en ambos casos existieron diferencias estadísticamente significativas.

Los metales y metaloides presentes en la sangre y tejidos de aves silvestres se deben principalmente a la ingestión de alimentos y agua (Binkowski y Sawicka-Kapusta, 2015; García-Fernández *et al.*, 1995; Orłowski *et al.*, 2012), lo que refleja la influencia de puede tener la contaminación metálica del hábitat en los niveles sanguíneos de los metales y otros elementos químicos.

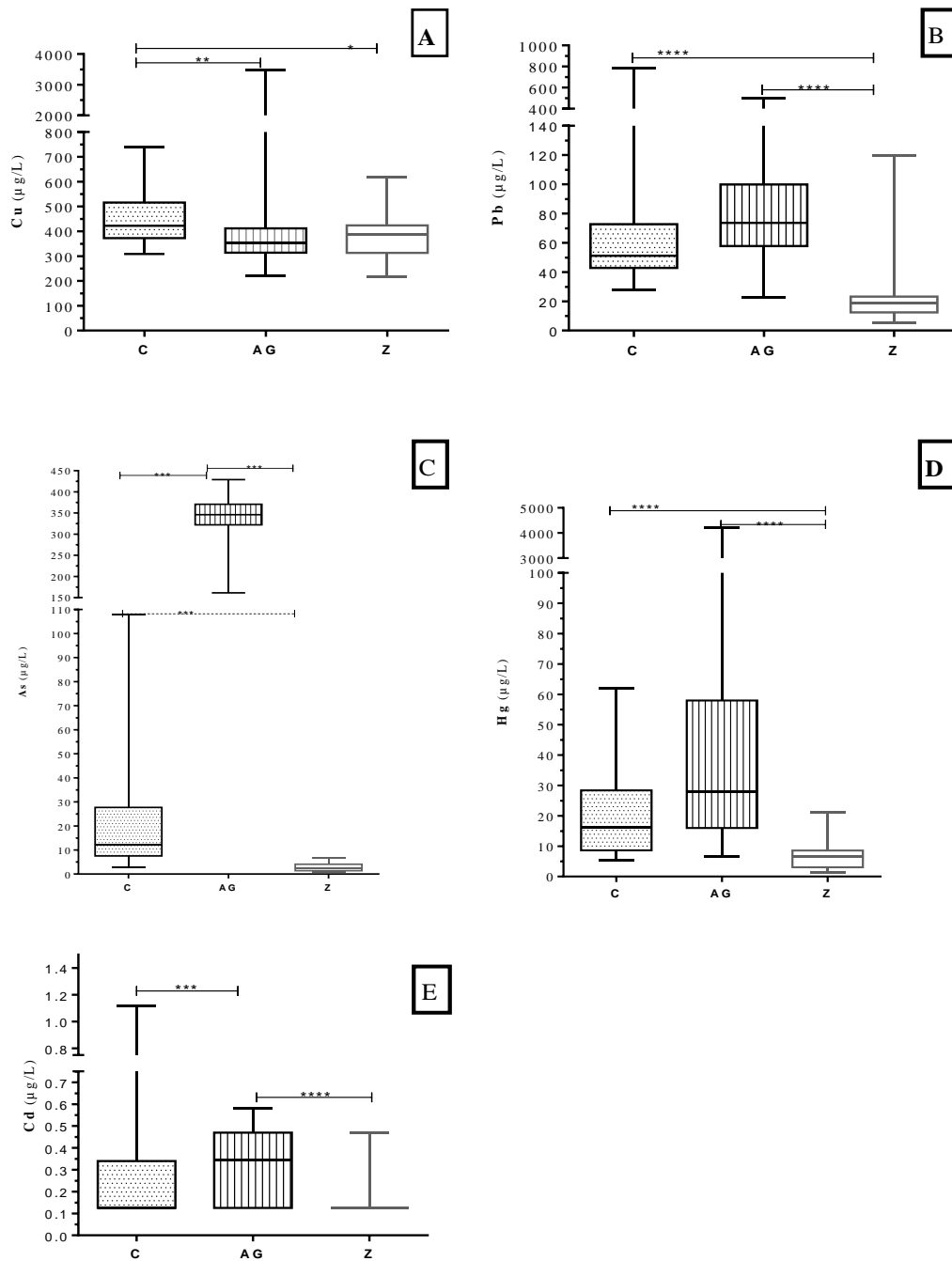


Figura 11. Niveles de metales y As en las 3 colonias, indicando valores de mediana, mínimo y máximo: A-Cu, B-Pb, C-As. D-Hg y E-Cd y el resultado del estudio comparativo para cada elemento entre las colonias (test de Kruskal-Wallis y *post hoc* de Dunn: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).



Tabla 37. Estadística descriptiva para los parámetros bioquímicos en plasma en las tres colonias estudiadas (C, AG y Z). Se detallan las diferencias significativas tras el *test* de Kruskal-Wallis y el *post hoc* de Dunn.

Parámetro	Colonia (A)	N	Rango	Median a	Media ± DE	KW (B)
AST (UI/L)	C	34	100-800	225,0	236,8 ± 114,4	ns
	AG	34	90-290	200,0	192,8 ± 50,06	
	Z	35	120-1840	190,0	249,4 ± 287,0	
GGT (UI/L)	C ^(a)	34	1,0-66	12,5	23,74 ± 20,20	***
	AG ^(b)	33	1,0-54,0	12,0	17,00 ± 13,48	
	Z ^(a,b)	35	1,0-76,0	50,0	43,74 ± 21,62	
LDH (UI/L)	C ^(a)	34	770-3894	1300	1397 ± 609,0	*
	AG ^(a)	34	40-3080	1037	1068 ± 555,0	
	Z	35	530-2550	1158	1158 ± 351,7	
CPK (UI/L)	C	34	270-1510	660	749,4 ± 330,1	ns
	AG	33	240-2160	840	879,4 ± 458,4	
	Z	35	190-1510	540	693,1 ± 353,8	
ALP (UI/L)	C ^(a)	34	129-1860	1130	1230 ± 456,9	***
	AG ^(a,b)	34	340-1940	945	958,5 ± 308,9	
	Z ^(b)	35	590-2040	1200	1237 ± 334,3	
Cl (mmol/L)	C ^(a)	34	102,5-134,3	110,90	113,10 ± 6,95	***
	AG ^(a,b)	31	104,7-143,1	121,30	122,5 ± 10,83	
	Z ^(b)	35	93,00-127,3	114,10	113,90 ± 5,48	
Na (mmol/L)	C ^(a,b)	34	136,2-168,9	141,50	143,10 ± 5,68	***
	AG ^(b)	33	125,4-176	147,10	151,20 ± 11,44	
	Z ^(a)	35	111-154,10	145,00	144,40 ± 6,72	
K (mmol/L)	C ^(a)	33	2,57-4,53	3,48	3,44 ± 0,51	***
	AG ^(a)	33	2,95-6,86	4,03	4,51 ± 1,25	
	Z ^(a)	33	2,280-4,120	2,94	3,00 ± 0,46	
Mg (mmol/L)	C ^(a,b)	34	0,12-1,32	0,78	0,75 ± 0,29	***
	AG ^(b)	34	0,66-3,13	1,13	1,32 ± 0,51	
	Z ^(a)	34	0,86-1,81	1,28	1,24 ± 0,20	
Ca (mmol/L)	C ^(a)	34	2-2,68	2,42	2,40 ± 0,15	***
	AG ^(b)	34	2,21-3,48	2,48	2,51 ± 0,22	
	Z ^(a,b)	35	2,35-2,95	2,57	2,58 ± 0,15	
P (mmol/L)	C ^(a)	34	0,74-4,1	1,34	1,62 ± 0,69	*
	AG	34	0,84-3,42	1,66	1,86 ± 0,66	
	Z ^(a)	34	1,07-2,84	1,84	1,86 ± 0,34	

(A) Test de Dunn: mismas letras entre colonias indican diferencias significativas entre ellas.

(B) K-W: Test de Kruskal-Wallis (ns: no significativo, * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001).



Tabla 37. (continuación)

Parámetro	Colonia ^(A)	N	Rango	Mediana	Media \pm DE	KW ^(B)
Glucosa (mmol/L)	C	34	11,21-18,87	15,77	15,35 \pm 1,95	ns
	AG	34	9,99-22,53	15,15	15,41 \pm 2,78	
	Z	35	13,21-18,76	15,10	15,29 \pm 1,12	
Colesterol (mmol/L)	C ^(a)	34	1,94-4,79	3,45	3,50 \pm 0,73	*
	AG	34	2,87-5,91	3,73	3,86 \pm 0,68	
	Z ^(a)	35	2,51-5,39	4,14	4,00 \pm 0,66	
Triglicéridos (mmol/L)	C ^(a,b)	34	0,15-1,04	0,58	0,58 \pm 0,19	***
	AG ^(b)	34	0,07-12,1	1,05	1,83 \pm 2,28	
	Z ^(a)	35	0,53-3,24	1,66	1,72 \pm 0,63	
PT (g/L)	C ^(a,b)	33	16-39	25,00	26,48 \pm 5,72	***
	AG ^(b)	34	22-119	30,00	37,24 \pm 19,60	
	Z ^(a)	33	28-40	35,00	35,30 \pm 2,93	
Albúmina (g/L)	C	34	10-21,3	17,30	16,99 \pm 2,46	*
	AG	32	9,8-33	18,25	18,80 \pm 3,68	
	Z	35	14,8-22,0	18,20	18,32 \pm 1,61	
Ácidos biliares (μ mol/L)	C ^(a)	33	2,2-57,6	17,80	21,01 \pm 15,94	*
	AG ^(a)	34	1-44,5	8,50	11,84 \pm 9,66	
	Z	35	2,7-55,60	17,50	17,67 \pm 11,07	
Ácido úrico (μ mol/L)	C ^(a)	34	160,6-773,4	324,20	358,0 \pm 149,4	***
	AG ^(b)	34	113,0-844,8	300,40	356,9 \pm 179,8	
	Z ^(a,b)	35	65,44-1208	529,50	533,2 \pm 232,5	
BUN (mmol/L)	C ^(a)	34	0,12-4,01	1,01	1,13 \pm 0,83	***
	AG ^(a)	34	0,13-10,42	2,18	2,68 \pm 2,39	
	Z ^(a)	34	0,35-4,33	1,71	2,01 \pm 1,04	

(A) Test de Dunn: mismas letras entre colonias indican diferencias significativas entre ellas.

(B) K-W: Test de Kruskal-Wallis (ns: no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Como se observa en la **Figura 11**, existieron diferencias significativas en todos los elementos químicos entre colonias. Para Hg, Pb y As los niveles más bajos estuvieron en la colonia Z (dentro de la Zona Especial de Protección de Aves, zona de pastizal), mientras que fueron mayores siempre en la colonia AG (junto a un área agrícola. ganado y cercanía a un centro de tratamiento de residuos sólidos urbanos). Los niveles significativamente más altos de As en la colonia AG fueron aproximadamente 14 veces mayores que en la colonia C y 124 veces más que en la colonia Z, probablemente debido a que al ser una zona agrícola se han podido usar pesticidas derivados de arsenicales que pueden contribuir a valores altos de As en la zona, como sucede en otras partes del mundo que todavía están contaminadas por este tipo de pesticidas (Levengood y Beasley, 2007). Si bien se detectaron diferencias significativas entre colonias, hay que destacar el hecho de detectar en la colonia AG algunos valores de Cu excesivamente altos, a la vez que fue la colonia con los niveles medios más bajos de las tres. Entre los factores que se relacionan con un mayor acúmulo de Cu en aves en zonas ganaderas, se cita el uso de suplementos minerales que se dan a los animales de granja y que contienen altos niveles de Cu, que se



excreta en las heces y contamina los suelos (Orlowski *et al.*, 2012). En el caso del Cd, si bien se realizó el estudio estadístico y aparecieron diferencias significativas no podemos tener en consideración clara estos resultados ya que un porcentaje muy alto de los valores fueron inferiores al límite de detección (el 83% de las muestras de la colonia Z, el 29% en AG y en el 72% de la colonia C).

Respecto a los parámetros bioquímicos plasmáticos, casi todos mostraron diferencias entre las colonias, salvo en el caso de la concentración de glucosa y de las actividades AST y CPK (**Tabla 37**). La colonia con el nivel más bajo de contaminación metálica, Z, exhibió los niveles medios más altos en 6 parámetros: ácido úrico, colesterol, Ca, ALP, GGT y AST. La menor contaminación podría ser una explicación a los mayores niveles de Ca y ALP, ya que Pb y Cd pueden interferir con las enzimas plasmáticas por competencia con elementos esenciales, como el Ca y la exposición a estos metales se relacionó también con la disminución de la actividad de ALP (Ramírez, 2011). La colonia con los niveles más elevados de contaminación por As, Pb y Hg, la colonia en zona agrícola-ganadera-vertedero (AG), no mostró valores más altos en ninguna actividad enzimática, cuando hubiera sido de esperar que fueran más altos por posibles alteraciones celulares. Sin embargo, en casi todos los electrolitos (en Cl, Na, K, Mg de forma significativa), así como en triglicéridos, proteínas totales, albúmina y BUN mostró los niveles medios más altos.

Se ha sugerido en humanos que la GGT se asocia linealmente con Pb, Cd y otros contaminantes (Lee *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestro caso encontramos una actividad GGT más alta en la colonia asociada a una más baja contaminación por metales. Los polimorfismos de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos se han demostrado en seres humanos (Lee *et al.*, 2009). No podemos descartar que un polimorfismo genético pueda explicar estas diferencias en las concentraciones plasmáticas de GGT y en las actividades de otras enzimas.

La LDH tuvo la actividad media más alta en la colonia C. Se ha reportado que las actividades de LDH son inhibidas por el metil-Hg en los pichones de garceta grande (Hoffman *et al.*, 2005), y que en la garza imperial (*Ardea purpurea*) los niveles de Hg y Cu en las plumas se relacionaron negativa y positivamente, respectivamente, con las actividades de LDH (Barata *et al.*, 2010). Sin embargo, según los mismos autores no se observó relación significativa entre el contenido de estos metales en las plumas y la LDH en la garceta común (*Egretta garzetta*).

Para intentar establecer de una forma más intensa las posibles relaciones entre cada elemento químico y cada parámetro plasmático se realizó un estudio de correlaciones mediante el test no paramétrico de Spearman, cuyos resultados estadísticos (valor de P para cada par respecto a cada colonia y con el conjunto global de los datos de los pollos) aparece en la **Tabla 38**.



Tabla 38. Estudio estadístico de correlaciones (valores de p) entre cada elemento (Cu, As, Hg y Pb) y cada parámetro bioquímico plasmático en función de cada colonia (C, AG y Z) y del conjunto global de pollos. Se detallan las correlaciones significativas mediante colores (verde=p<0,05; azul=p<0,01 y rojo=p<0,001).

Elemento	Cobre				Arsénico				Mercurio				Plomo			
	Z	C	AG	GLOBAL	Z	C	AG	GLOBAL	Z	C	AG	GLOBAL	Z	C	AG	GLOBAL
AST	0,0787	0,5701	0,0095	0,2844	-0,1189	-0,3313	0,2368	0,0166	-0,1405	-0,0222	0,1908	0,0751	-0,1797	-0,0770	-0,2394	0,0249
GGT	0,1296	0,1828	0,0287	0,1180	-0,2653	-0,4421	-0,0001	-0,5336	-0,0957	-0,0097	-0,0321	-0,3658	0,0796	-0,3072	0,0446	-0,4189
LDH	-0,4603	0,3103	-0,0942	0,0071	-0,3454	0,1319	0,0649	0,0069	0,1450	0,2186	0,3206	0,1356	-0,0389	0,1208	0,0565	0,0274
CPK	-0,0150	0,2745	0,4178	0,1890	-0,0219	-0,2437	0,1590	0,1067	-0,4338	-0,1503	-0,0126	-0,0098	-0,0396	-0,0831	-0,4049	0,0215
ALK	-0,1349	-0,0214	0,4568	0,1857	0,0917	0,2011	-0,1095	-0,1845	-0,1108	0,2015	-0,4619	-0,2682	0,1228	0,0030	-0,4784	-0,2355
Cl	0,3743	-0,3623	0,6254	0,0394	0,5104	0,0085	0,0643	0,1710	-0,4425	-0,1039	-0,1997	0,0048	0,2258	-0,1321	-0,4420	0,0626
Na	0,3502	-0,0147	0,5155	0,0318	0,2404	0,0606	0,0848	0,0736	-0,3832	-0,1284	-0,0396	0,0126	0,0365	-0,1102	-0,4883	-0,0307
K	0,4278	-0,2338	0,2225	0,0595	0,5538	0,2425	0,0397	0,5996	-0,5716	-0,0461	-0,1533	0,2917	0,2131	0,0209	-0,1295	0,4765
Mg	-0,1973	0,0254	-0,0053	-0,2697	-0,1510	0,1863	-0,0157	-0,1792	0,2280	0,1743	-0,1633	-0,0902	-0,1435	0,0434	-0,0396	-0,1472
Ca	-0,0015	-0,2479	0,2663	-0,0821	-0,1259	0,3711	0,3723	-0,1443	0,2315	-0,0061	-0,2226	-0,2023	-0,1870	0,0708	-0,3245	-0,3474
P	-0,2440	-0,5229	0,4300	-0,1987	-0,4708	0,3869	0,2114	-0,0784	0,0015	-0,0026	-0,0541	-0,1246	-0,4221	0,1403	-0,3339	-0,2616
Glucosa	-0,0343	-0,2821	0,0778	-0,0390	0,1000	-0,2651	-0,2061	-0,0630	-0,2593	-0,0738	-0,2923	-0,0888	-0,1235	-0,1739	0,1884	-0,0536
Colesterol	-0,0412	0,6152	-0,3005	-0,0069	-0,4802	-0,4324	-0,0192	-0,3365	0,1900	-0,2170	0,1494	-0,1129	-0,2735	-0,3651	-0,0240	-0,2774
Triglicéridos	-0,2628	-0,0144	-0,0918	-0,2699	-0,7167	-0,3891	0,1111	-0,4239	0,1360	-0,3722	-0,0394	-0,2964	-0,3111	-0,2026	-0,0052	-0,3444
P. Total	0,3649	-0,3354	0,3978	-0,0313	-0,2229	0,0705	-0,0279	-0,2363	0,2157	-0,1611	-0,1149	-0,1862	0,0632	-0,1505	-0,2752	-0,2603
Albumina	0,3525	0,3488	0,0826	0,1641	0,1732	-0,0075	0,0074	-0,0086	0,1326	-0,0046	0,1935	0,0598	0,0294	-0,3770	-0,2046	-0,1181
Ác. biliares	-0,1636	0,3609	-0,3799	0,0412	-0,4767	-0,4897	-0,1843	-0,3447	-0,0834	-0,0694	0,1212	-0,1257	-0,1438	-0,2438	0,2716	-0,1729
Ác. úrico	0,1239	0,4565	0,0686	0,0893	-0,1985	-0,6554	0,1472	-0,4666	-0,1229	-0,1912	0,2669	-0,2656	0,0533	-0,3931	0,0323	-0,3708
BUN	-0,0706	-0,1596	0,3710	-0,0965	0,0460	0,3190	0,0300	0,0006	-0,0630	0,1111	-0,3273	-0,1404	-0,0951	-0,0216	-0,0877	-0,1065



De forma general, como se observa en la **Tabla 38**, no existió una tendencia clara en las distintas correlaciones encontradas, ya que para cada elemento químico los patrones fueron distintos para cada colonia, bien porque en unas eran significativas y en otras no, o en unas eran de signo positivo y en otras de signo negativo. El mayor número de correlaciones significativas entre colonias se encontró para el caso del Cu; sin embargo, cuando se estudiaron todos los pollos en conjunto, fue el elemento que menor número de correlaciones significativas mostró (solo 3). El Hg tuvo el número más bajo de correlaciones de los 4 elementos, tanto considerando las colonias como el total de los pollos (6). El As mostró el mismo número total de correlaciones (22) que el Cu, si bien fue el que más correlaciones de mayor significación tuvo con los datos globales, siendo todas, menos la del K, de carácter negativo. El Pb tuvo mayor número de correlaciones significativas, y de mayor significación estadística, considerando el global de los pollos respecto a las colonias, si bien en la colonia AG (la de mayor nivel medio de Pb) fue donde tuvo el mayor número de correlaciones significativas.

Considerando únicamente los datos globales, en conjunto, de todos los pollos, 7 parámetros bioquímicos no mostraron ninguna correlación significativa (las actividades LDH y CPK, los iones Cl y Na, y la glucosa, albúmina y el BUN), 4 parámetros fueron significativos para un solo elemento (AST y Mg para Cu, P para Pb, y ácidos biliares para As), 4 parámetros fueron significativos para 2 elementos (ALK, Ca, colesterol, proteínas totales), 3 parámetros fueron significativos para 3 elementos (GGT, K y ácido úrico) y solo 1 parámetro fue significativo para los 4 elementos (triglicéridos).

Es llamativo que la colonia AG, que es la que mayores niveles medios de elementos tóxicos (As, Hg y Pb) mostró, fue la que tuvo un menor número de correlaciones significativas, únicamente 13 y solo 1 de ellas con $P < 0,001$. Por el contrario, la colonia que tuvo los niveles medios de metales más bajos, colonia Z y en un entorno de menor contaminación, fue la que tuvo un mayor número de correlaciones significativas (un total de 18), de las cuales 3 fueron altamente significativas ($P < 0,001$) y 7 de significación media ($P < 0,01$).

A modo de ejemplo aparece a continuación la **Figura 12**, donde se representan las correlaciones entre los niveles de As sanguíneo con los niveles de K y la actividad enzimática GGT en plasma en el global de los pollos, siendo la primera de carácter positivo y la segunda de carácter negativo.

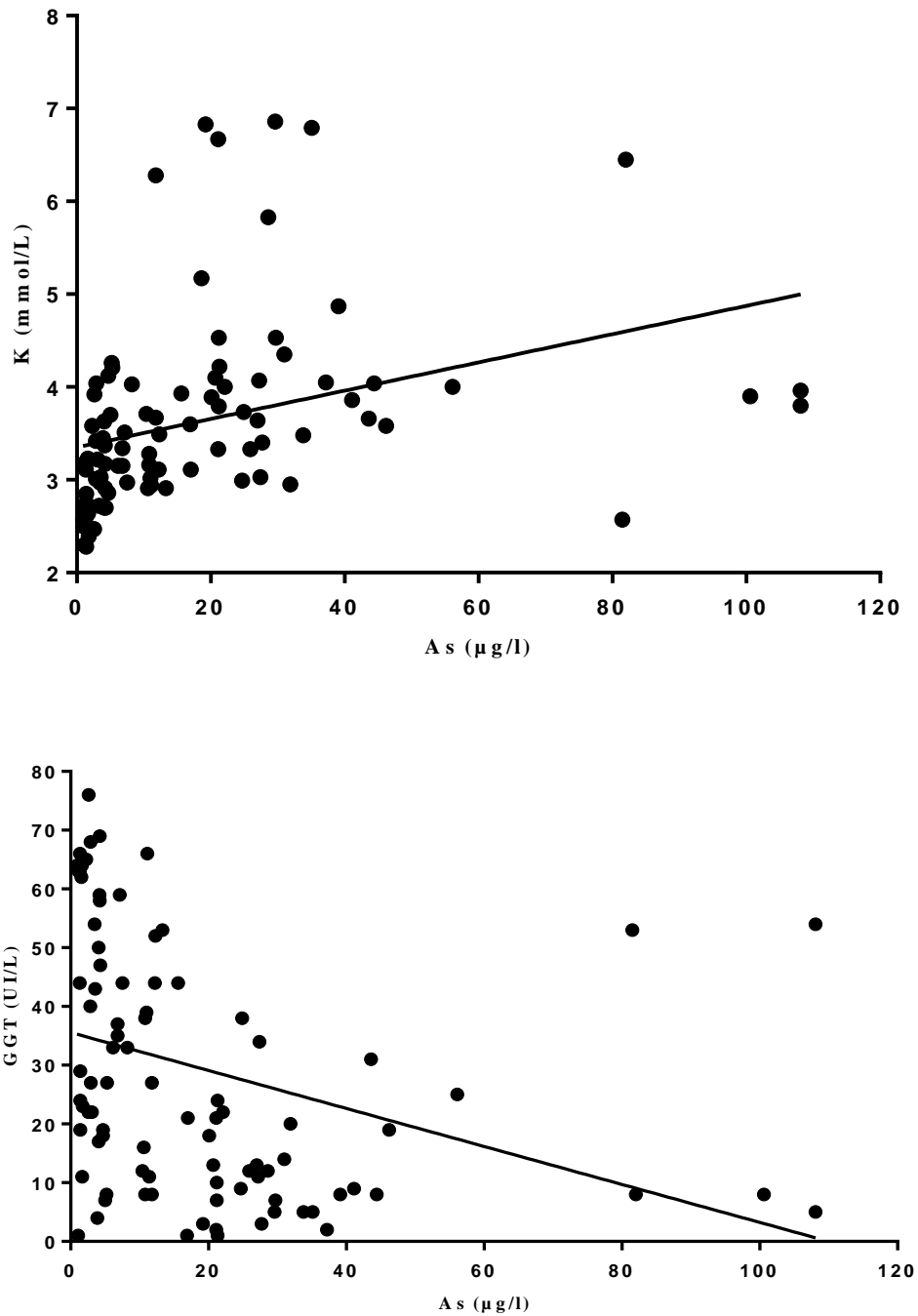


Figura 12. Representación gráfica de las correlaciones más significativas (As-K y As-GGT) encontradas entre elementos químicos y parámetros bioquímicos plasmáticos usando el total de los pollos de las 3 colonias.



IV.4. CONCLUSIONES

Confirmamos que la bioquímica sanguínea de la cigüeña blanca varía con la edad, pero no encontramos diferencias significativas entre sexos en los pollos de cigüeñas blancas.

En el conjunto de los parámetros bioquímicos, salvo la actividad LDH, ningún otro parámetro mostró diferencias significativas entre el grupo de juveniles (<1 año) y el grupo de adultas (>2 años), lo que indica que no existe un cambio progresivo con la edad, sino que las diferencias se establecen entre dos grupos bien diferenciados: los pollos en el nido y los animales que ya tiene capacidad plena de vuelo.

Las actividades enzimáticas de LDH, CPK y ALP fueron significativamente mayores en las aves más jóvenes, disminuyendo progresivamente hasta las más adultas; en cambio la actividad de AST fue mayor en adultos. La única actividad enzimática que no se vio influenciada por la edad fue la GGT.

En el grupo de los electrolitos, únicamente no hubo diferencias influenciadas por la edad en el caso del Cl y del Na, siendo nuestro trabajo el primero de la bibliografía en reportar valores de Cl en la cigüeña blanca.

Del resto de los 8 parámetros bioquímicos analizados, los niveles de glucosa, triglicéridos, ácido úrico y BUN no se vieron afectados por el factor edad.

En pollos de tres colonias de localizaciones e influencias ambientales diferentes, existieron diferencias claras en las concentraciones sanguíneas de los elementos Cu, Pb, Hg y As, así como en los valores de los distintos parámetros bioquímicos plasmáticos. Sin embargo, no fue posible establecer una relación clara, común y justificada entre los niveles de los elementos químicos y los valores de los distintos parámetros bioquímicos, si bien se encontraron diversas correlaciones dentro de cada colonia y a nivel global cuando se estudió el conjunto del total de los pollos.

Deberían desarrollarse nuevos estudios para evidenciar las posibles correlaciones entre elementos químicos y parámetros bioquímicos plasmáticos, para lo cual sería interesante realizarlos usando colonias situadas en ambientes donde existiese una clara contaminación ambiental por estos elementos, como pudieran ser colonias situadas en entornos cercanos a explotaciones mineras o zonas de alta actividad industrial, y compararlos con colonias “controles” como la colonia Z, que está situada en una zona ZEPA.

IV.5. REFERENCIAS

- Alonso J.C., Huecas V., Alonso J.A., Abelenda M., Muñoz-Pulido R., Puerta M.L. (1991). Hematology and blood chemistry of adult white storks (*Ciconia ciconia*). *Comp. Biochem Physiol A: Physiology* 98: 395–397.
- Alvarez C.R., Moreno M.J., Alonso L.L., Gómara B., Bernardo F.J.G., Martín-Doimeadios R.C.R., González M.J. (2013). Mercury, methylmercury, and selenium in blood of bird



- species from Doñana national park (Southwestern Spain) after a mining accident. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20(8): 5361-5372.
- Baos R., Jovani R., Pastor N., Tella J.L., Jiménez B., Gómez G., González M.J., Hiraldo F. (2006). Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(10): 2794–2803.
- Barata C., Fabregat M.C., Cotín J., Huertas D., Solé M., Quirós L., Sanpera C., Jover L., Ruiz X., Grimalt J.O., Piña B. (2010). Blood biomarkers and contaminant levels in feathers and eggs to assess environmental hazards in heron nestlings from impacted sites in Ebro basin (NE Spain). *Environ. Pollut.* 158(3): 704–710.
- Batista L.S.G. (2012). Hematologia e Bioquímica sanguínea em jovens de cegonha-branca (*Ciconia ciconia*) no estado selvagem. Tese de máster. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Recuperado el 23/03/2018 de <http://hdl.handle.net/10400.5/3842>.
- Beeby A. (2001). What do sentinels stand for? *Environ. Pollut.* 112(2): 285–298.
- Benito V., Devesa V., Muñoz O., Suñer M.A., Montoro R., Baos R., Hiraldo F., Ferrer M., Fernández M.A., González M.J. (1999). Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci. Total Environ.* 242(1-3): 309-323.
- Berglund Å.M., Ingvarsson P. K., Danielsson H., Nyholm N.E.I. (2010). Lead exposure and biological effects in pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) before and after the closure of a lead mine in northern Sweden. *Environ. Pollut.* 158: 1368–1375.
- Binkowski Ł.J., Sawicka-Kapusta K. (2015). Lead poisoning and its in vivo biomarkers in mallard and coot from two hunting activity areas in Poland. *Chemosphere* 127: 101–108.
- Blázquez E., Aguirre J., Martínez-Haro M., Mateo R., Jiménez B. (2006). The use of White stork (*Ciconia ciconia*) nestlings in a biomonitoring programme for organochlorines through the region of Madrid (Spain). *Organohalogen Compd.* 68: 2081–2084.
- Cabo P., Espín S., Martínez-López E., Roscales J.L., Jiménez B., García-Fernández A.J. (2012). Metales pesados en sangre de pollos de cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) de Madrid y Aragón. *Rev. Toxicol.* 29(1): 72.
- Campbell T.W. (2012). Clinical Chemistry of Birds. En: Thrall M.A., Weiser G., Allison R.W (eds), *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2a ed.). John Wiley Sons, New Jersey, pp. 582–598.
- Carneiro M., Colaço B., Brandão R., Ferreira C., Santos N., Soeiro V., Colaço A., Pires M.J., Oliveira P.A., Lavín S. (2014). Biomonitoring of heavy metals (Cd, Hg, and Pb) and metalloid (As) with the Portuguese common buzzard (*Buteo buteo*). *Environ. Monit. Assess.* 186(11): 7011–7021.
- Champoux L., Rodriguez J., Trudeau S., Boily M.H., Spear P.A., Hontela A. (2006). Contamination and biomarkers in the great blue heron, an indicator of the state of the St. Lawrence River. *Ecotoxicology* 15(1): 83-96.



- Cordi B., Fossi C., Depledge M. (1997). Temporal biomarker responses in wild passerine birds exposed to pesticide spray drift. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 2118–2124.
- de la Casa-Resino I. (2014a). Nuevos horizontes en ecotoxicología: biomarcadores destructivos y no destructivos en codorniz (*Coturnix coturnix*) y cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*). Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Recuperado el 15/01/2019 de <http://dehesa.unex.es/handle/10662/2284>.
- de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Pérez-López M., Soler F. (2014b). Breeding near a landfill may influence blood metals (Cd, Pb, Hg, Fe, Zn) and metalloids (Se, As) in white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings. *Ecotoxicology* 23: 1377–1386.
- de la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Castellano A., Soler F., Pérez-López M. (2015). Biomarkers of oxidative status associated with metal pollution in the blood of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain. *Toxicol. Environ. Chem.* 97: 588–598.
- Doneley B. (2007). Biochemistries: What they do and don't do. En: Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association Conference Sydney, Australia, 2007. WSAVA, pp. 1537–1540.
- Fossi M.C. (1994). Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.* 102 (12): 49–54.
- Fossi C., Leonzio C. (1993). Nondestructive biomarkers in vertebrates. CRC Press.
- Franson J.C., Hoffman D.J., Schmutz A. (2002). Blood selenium concentrations and enzyme activities related to glutathione metabolism in wild emperor geese. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 2179–2184.
- Furness R. (1993). Birds as monitors of pollutants. En: Furness R., Greenwood J. (eds.) *Birds as Monitors of Environmental Change*. Chapman and Hall, London, pp. 86–131.
- García-Fernández A.J., Sánchez-García J.A., Jiménez-Montalbán P., Luna A. (1995). Lead and cadmium in wild birds in Southeastern Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 14(12): 2049–2058.
- Geens A., Dauwe T., Bervoets L., Blust R., Eens M. (2010). Haematological status of wintering great tits (*Parus major*) along a metal pollution gradient. *Sci. Total Environ.* 408(5): 1174–1179.
- Griffiths R., Daan S., Dijkstra C. (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1374): 1251–1256.
- Han J.I., Jang H.J., Na K.J. (2016). Hematologic and serum biochemical reference intervals of the Oriental white stork (*Ciconia boyciana*) and the application of an automatic hematologic analyzer. *J. Vet. Sci.* 17(3): 399–406.
- Harr K.E. (2002). Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Vet. Clin. Path.* 31: 140–151.
- Hill E.F., Fleming W.J. (1982). Anticholinesterase poisoning of birds: field monitoring and diagnosis of acute poisoning. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 27–38



- Hochleithner M. (1994). Biochemistries. En: Ritchie B.W., Harrison, G.J. Harrison L.R. (eds.), *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida, pp. 223–245.
- Hoffman D.J., Spalding M.G., Frederick P.C. (2005). Subchronic effects of methylmercury on plasma and organ biochemistries in Great egret nestlings. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(12): 23–23.
- Jenkins J.R. (1994). Avian metabolic chemistries. *Semin. Avian Exotic Pet Med.* 3: 25–32.
- Jerzak L., Sparks T.H., Kasprzak M., Bochenski M., Kaminski P., Wiśniewska E., Mroczkowski S., Tryjanowski P. (2010). Blood chemistry in white stork *Ciconia ciconia* chicks varies by sex and age. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 156: 144–147.
- Kamiński P., Kurhalyuk N., Szady-Grad M. (2007). Heavy metal-induced oxidative stress and changes in physiological process of free radicals in the blood of White stork (*Ciconia ciconia*) chicks in polluted areas. *Pol. J. Environ. Stud.* 16(4): 555–562.
- Kamiński P., Kurhalyuk N., Szady-Grad M., Tkachenko H., Kasprzak M., Jerzak L. (2008). Chemical elements in the blood of white stork *Ciconia ciconia* chicks in differential Poland regions. *Med. Biol. Sci.*, 22(4): 31–37.
- Kamiński P., Jerzak L., Sparks T.H., Johnston A., Bochenski M., Kasprzak M., Wiśniewska E., Mroczkowski S., Tryjanowski P. (2014). Sex and other sources of variation in the haematological parameters of White Stork. *J. Ornithol.* 155(1): 307–314.
- Kerr M.G. (2002). Clinical Biochemistry. En: Kerr M.G (ed.), *Veterinary Laboratory Medicine Clinical Biochemistry and Haematology*. Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 69–148.
- Lanzarot M.P., Barahona M.V., Andrés M.I.S., Fernández-García M., Rodríguez C. (2005). Hematologic, protein electrophoresis, biochemistry, and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*Ciconia nigra*). *J. Wildl. Dis.* 41(2): 379–386.
- Lee D.H., Jacobs Jr.D.R. (2009). Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants? *Free Radic. Res.* 43(6): 533–537.
- Levengood J.M., Beasley V.R. (2007). Principles of Ecotoxicology. En: Gupta R.C. (ed), *Veterinary Toxicology* (2a ed.) Academic Press, Oxford, pp. 689–708.
- Liu J., Goyer R.A., Waalkes M.P. (2010). Toxic Effects of Metals. En: Klaassen, C.D. Watkins, J.B.III (eds), *Casarett Doull's Essentials of Toxicology*, (2a ed.) McGraw Hills Companies, China, pp. 323–333.
- Lumeij J.T. (2008). Avian Clinical Biochemistry. En: Kaneko J.J., Harvey J. W. Bruss M.L. (eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6a ed.). Academic Press, Elsevier, pp. 839–872.
- Maceda-Veiga A., Figuerola J., Martínez-Silvestre A., Viscor G., Ferrari N., Pacheco M. (2015). Inside the Redbox: Applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Sci. Total Environ.* 514: 322–332.
- Maia A.R., Soler-Rodriguez F., Pérez-López M. (2017). Concentration of 12 Metals and Metalloids in the Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*): Basal Values and Influence of Age and Gender. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73(4): 522–532.



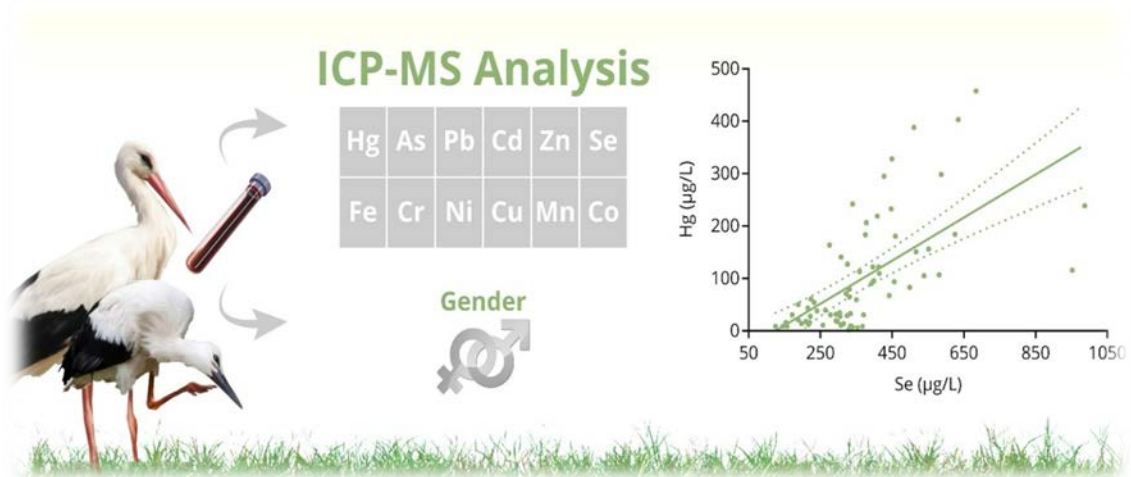
- Martinson S.C., Eulaers I., Jaspers V.L.B., Covaci A., Eens M., Letcher R.J., Fernie K.J. (2017). Transfer of hexabromocyclododecane flame retardant isomers from captive American kestrel eggs to feathers and their association with thyroid hormones and growth. *Environ. Pollut.* 220: 441-451.
- Meharg A.A., Pain D.J., Ellam R.M., Baos R., Olive V., Joyson A., Powell N., Green A.J., Hiraldo F. (2002). Isotopic identification of the sources of lead contamination for white storks (*Ciconia ciconia*) in a marshland ecosystem (Donana, SW Spain). *Sci. Total Environ.* 300: 81-86.
- Montesinos A., Sainz A., Pablos M.V., Mazzucchelli F., Tesouro M.A. (1997). Hematological and plasma biochemical reference intervals in young white storks. *J. Wild. Dis.* 33(3): 405-412.
- Mostaghni K., Badiei K., Nili H., Fazeli A. (2005). Haematological and biochemical parameters and the serum concentrations of phosphorus, lead, cadmium and chromium in flamingo (*Phoenicopterus ruber*) and black-headed gull (*Larus ridibundus*) in Iran. *Comp. Clin. Pathol.* 14: 146-148.
- Muriel R., Schmidt D., Calabuig C.P., Patino-Martinez J., Ferrer M. (2013). Factors affecting plasma biochemistry parameters and physical condition of Osprey (*Pandion haliaetus*) nestlings. *J. Ornithol.* 154(3): 619-632.
- Norte A.C., Sheldon B., Paulo Sousa, J., Albino Ramos, J. (2008). Repeatability and method-dependent variation of blood parameters in wild-caught Great Tits *Parus major*. *Acta Ornithol.* 43(1): 65-75.
- Orlowski G., Kamiński P., Kasprzykowski Z., Zawada Z., Koim-Puchowska B., Szady-Grad M., Klawe J.J. (2012). Essential and nonessential elements in nestling rooks *Corvus frugilegus* from eastern Poland with a special emphasis on their high cadmium contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63(4): 601-611.
- Pérez-López M., De la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Galeano J., Míguez-Santiyán M.P., de Castro-Lorenzo A., Otero-Filgueiras M., Rivas-López O., Soler F. (2016). Concentrations of metals, metalloids, and chlorinated pollutants in blood and plasma of White stork (*Ciconia ciconia*) nestlings from Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 71(3): 313-321.
- Peris S.J. (2003). Feeding in urban refuse dumps: ingestion of plastic objects by the white stork (*Ciconia ciconia*). Alimentación en basureros: La ingestión de objetos de plástico por la cigüeña blanca. *Ardeola* 50(1): 81-84.
- Polo F.J., Celdran J., Viscor G., Palomeque J. (1994). Blood chemistry of captive herons, egrets, spoonbill, ibis and gallinule. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.*, 107(2), 343-347.
- Puerta M.L., Pulido R.M., Huecas V., Abelenda M. (1989). Hematology and blood chemistry of chicks of white and black storks (*Ciconia ciconia* and *Ciconia nigra*). *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* 94(2): 201-204.
- Quirós L., Ruiz X., Sanpera C., Jover L., Piña B. (2008). Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (NE Spain). *Environ. Pollut.* 155: 81-87.



- Ramírez M.P.G. (2011). El Búho real (*Bubo bubo*) como especie biomonitora de contaminantes ambientales persistentes en el sureste de España. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. Recuperado el 18/01/2019 de <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/25653/1/TPGR.pdf>.
- Serrato F.B., Díaz A.R., Sarría F.A., Brotóns J.M., López S.R. (2010). Afección de suelos agrícolas por metales pesados en áreas limítrofes a explotaciones mineras del sureste de España. *Papeles de Geografía* 51–52: 45–54.
- Sonne C., Bustnes J.O., Herzke D., Jaspers V.L., Covaci A., Eulaers I., Halley D.J., Moum T., Ballesteros M., Eens M. (2012). Blood plasma clinical–chemical parameters as biomarker endpoints for organohalogen contaminant exposure in Norwegian raptor nestlings. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 80: 76–83.
- Stout J.D., Brinker D.F., Driscoll C.P., Davison S., Murphy L. A. (2010). Serum biochemistry values, plasma mineral levels, and whole blood heavy metal measurements in wild Northern goshawks (*Accipiter gentilis*). *J. Zoo Wildlife Med.* 41(4): 649–655.
- Szabó Z., Beregi A., Vajdovich P., Abonyi-Tóth Z., Mátrai E., Pazár P., Gaál T. (2010). Hematologic and Plasma Biochemistry Values in White Storks (*Ciconia ciconia*). *J. Zoo Wildlife Med.* 41(1): 17–21.
- Van den Bossche W., BertholdP., Kaatz M., Nowak E., Querner U. (2002). Eastern European White Stork populations: migration studies and elaboration of conservation measures. German Agency Natural Conservation, Bonn.
- Vos J.G., Dybing E., Greim H.A., Ladefoged O., Lambré C., Tarazona J.V., Brandt I., Vethaak A.D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30(1): 71-133.



DISCUSIÓN GENERAL





DISCUSIÓN GENERAL

Los datos de programas de monitoreo desempeñan un papel importante en el diseño y la evaluación de los estudios que utilizan bioindicadores, porque su análisis detallado es útil en la tomada de decisiones (Breckenridge *et al.*, 2003). Actualmente disponemos de técnicas de análisis químico que permiten detectar en los tejidos, incluyendo la sangre, elementos o sustancias en concentraciones a muy bajo nivel (como es el caso de la ICP-MS utilizada en esta tesis) y también se han desarrollado técnicas para evaluar efectos nocivos debidos al estrés ambiental. Ambas técnicas proporcionan a todos los que trabajan en disciplinas como la Salud Pública, Toxicología y Ecotoxicología, herramientas importantes para comprender mejor cómo los sistemas biológicos y ecológicos pueden ser impactados por agentes químicos (Breckenridge *et al.*, 2003). Los biomarcadores y bioindicadores se confirman como componentes esenciales de los esquemas de monitoreo ambiental (Burger, 2008; Gil y Pla, 2001).

Entre la gran diversidad de sustancias químicas consideradas como contaminantes ambientales, y por tanto capaces de difundirse por el medio ambiente y poder afectar seriamente al desarrollo y vida de los seres vivos que habitan ese medio ambiente, tanto a nivel individual como poblacional, están diversos elementos químicos presentes en la tabla periódica. Algunos de ellos, concretamente Pb, Cd, Hg y As, son considerados los de mayor toxicidad, tanto tras exposiciones de forma aguda como crónica, y su difusión en el medio ambiente es consecuencia fundamental de la actividad humana. Es este el motivo de que, desde que se tiene conciencia del problema medioambiental que pueden originar, paulatinamente hayan ido surgiendo distintas normativas oficiales tendentes a intentar reducir y minimizar su contaminación y afección a los seres vivos, entre ellos por supuesto los humanos.

La cigüeña blanca se ha utilizado en esta tesis con el objetivo de demostrar su utilidad como bioindicador de la contaminación por estos compuestos, teniendo en consideración que reúne muchas de las características descritas para que un ave sea considerada como buen bioindicador (Becker, 2003), y siendo una de las especies más representativas del ecosistema extremeño (de la Casa-Resino, 2014), donde se desarrolló esta investigación.

La sangre se ha utilizado como muestra no destructiva en esta tesis, sabiendo que es una muestra adecuada para evaluar la exposición reciente a muchos contaminantes, ya que transporta y distribuye los contaminantes en el organismo, lo que la hace una muestra útil y adecuada para el cribado de contaminantes en vertebrados (Maceda-Veiga *et al.*, 2015). La movilización de metales desde otros tejidos a sangre es insignificante y, aunque el contenido de metales pesados en los polluelos después de la eclosión puede derivar de su presencia en el huevo, se ha indicado que la contribución del contenido de metales en los huevos sobre la carga metálica en el animal es mínima en comparación con la de la exposición a través del alimento (reflejo de la contaminación en su hábitat) desde la eclosión hasta que empluman (Blanco *et al.*, 2003; Gariboldi *et al.*, 2001; Tsipoura *et al.*, 2008).



A lo largo de los capítulos de esta tesis el uso de la cigüeña blanca como especie bioindicadora y de la sangre como muestra no destructiva demostraron que son recursos adecuados a los objetivos propuestos.

Inicialmente se consideró la necesidad de disponer de datos sobre la carga de estos contaminantes inorgánicos en ejemplares de cigüeña blanca residentes en Extremadura, y estudiar la influencia de la edad y el sexo sobre ellos. Y no solamente de los elementos químicos considerados más tóxicos (Pb, Cd, Hg y As), para los que hay más normas legales para controlar emisiones, uso y aplicaciones, sino de otros metales y no metales menos estudiados, y por tanto con conocimiento limitado sobre sus valores en especies salvajes. En la presente tesis se determinaron las concentraciones sanguíneas en sangre completa, y de forma simultánea, de 12 elementos químicos, siendo la primera vez en la literatura científica, según nuestro conocimiento, que se reportan en adultos y pollos de la cigüeña blanca (Capítulo I), lo que sirve de base para monitorear sus tendencias en el futuro. Además, es uno de los muy escasos trabajos que han estudiado los niveles de Cr y Ni en aves, si bien fueron los elementos con menor índice de detección (57 % y el 35 % de los datos eran < LD, respectivamente). En general, los niveles de metales resultaron similares a los indicados en la literatura existente para la misma especie ubicada en distintos lugares de Europa, principalmente España y Polonia. Los elementos con concentraciones sanguíneas medias más elevadas fueron, como era esperado, los 4 elementos considerados esenciales: Fe > Zn > Cu > Se, seguidos del Pb > Hg > Mn > As > Ni > Cr > Co > Cd. No existieron diferencias en función del sexo de los ejemplares y si respecto a la edad, encontrando valores superiores en adultos para Ni, Cu, Se y Hg, mientras que en pollos fue mayor el Pb. Esto último indica que hay que poner cuidado en la interpretación de los datos de esos elementos en la biomonitorización ya que es necesario tener en cuenta la edad de los ejemplares.

Está descrito que la utilización de biomarcadores es una forma directa de medir la alteración biológica y bioquímica provocada por elementos tóxicos, como los metales, en los animales (Vanparys *et al.*, 2008). En una reciente revisión bibliográfica sobre los efectos del Pb en aves y otros animales silvestres, Pain *et al.* (2019) refieren que las tendencias en la investigación de intoxicaciones por Pb en aves reflejan las de la medicina humana, con efectos detectados a niveles cada vez más bajos de exposición y absorción de Pb. En el Capítulo II estudiamos la inhibición de la enzima sanguínea Δ -ALAD, biomarcador de exposición y efecto al Pb, observando una inhibición dosis dependiente, incluso con concentraciones de Pb en sangre consideradas generalmente bajas (<50 $\mu\text{g/L}$) siendo mucho más intensas cuando los niveles de Pb en sangre superaron los 200 $\mu\text{g/L}$. De hecho, la mayor inhibición enzimática de Δ -ALAD (menor actividad de la enzima: 12,9 $\mu\text{mol PBG/h/L GR}$) ocurrió en la muestra con el nivel máximo de Pb (780,5 $\mu\text{g/L}$) y la máxima actividad Δ -ALAD (907,3 $\mu\text{mol PBG/h/L GR}$) se observó en una muestra con los niveles más bajos de Pb (11,6 $\mu\text{g/L}$). La actividad de Δ -ALAD se ha revelado como un biomarcador muy sensible a la exposición al Pb, habiéndose encontrado que concentraciones de Pb >30 $\mu\text{g/L}$ producen una inhibición significativa (> del 30%) sobre dicha actividad enzimática, por lo que hemos establecido esta concentración de Pb como umbral de efecto sobre la enzima de la cigüeña blanca. Esta concentración es inferior al



reportado por otros autores en otras especies de aves, lo que indica una mayor sensibilidad de la cigüeña blanca frente a otras aves respecto a los efectos bioquímicos del Pb.

Al influir el Pb sobre la formación del grupo hemo, uno de sus efectos tóxicos crónicos es la producción de una anemia con disminución del hematocrito de los niveles de hemoglobina sanguínea. En nuestro trabajo se comprobó que no hubo un efecto sobre estos parámetros hasta que la concentración de Pb en sangre era mayor de 100 $\mu\text{g/L}$, lo que demuestra que la determinación de $\Delta\text{-ALAD}$ (como biomarcador bioquímico) es más sensible a la exposición al Pb que la determinación del hematocrito o de la hemoglobina (biomarcadores de efecto).

La contaminación por algunos elementos tóxicos, como los metales Pb, Cd y Hg, presenta en Europa una tendencia decreciente (European Environment Agency, 2019). Esta tendencia se ha estudiado en el Capítulo III, donde se verificó una tendencia temporal hacia una clara disminución entre las concentraciones medias de Pb, Hg y As en sangre de pollos de una misma colonia de cigüeña blanca entre los años 1988/89 y 2008/09. De esta forma se logró comprobar el impacto positivo de algunas medidas restrictivas en la producción y en el uso de estos elementos contaminantes, concretamente, entre otras, el Real Decreto 785/2001, que transpuso la Directiva Europea 98/70/CE del Parlamento y del Consejo y prohibió el uso específico de gasolina con plomo a partir del 1 de agosto de 2001, y el Real Decreto 1406/1989, que estableció una serie de limitaciones a la comercialización y al uso de determinadas sustancias y preparados químicos, entre ellos los elementos químicos estudiados en esta tesis. Esta última norma, también transposición de la normativa de la Unión Europea que regula esta materia, fundamentalmente la Directiva 76/769/CEE del Consejo, de 27 de julio, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos, sufrió posteriores modificaciones y adaptaciones al progreso técnico que han incidido directamente provocando una progresión negativa del impacto ambiental de esos tóxicos. También conviene citar el denominado Reglamento REACH (Reglamento CE 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo) que vino a sustituir a las anteriores normas europeas y que ha supuesto un hito en la regulación de las sustancias químicas en la Unión Europea, si bien esta norma ha tenido efecto real con posterioridad a la toma de muestras que se ha hecho en este trabajo.

Para el estudio de los efectos tóxicos de los contaminantes es necesario conocer los valores de referencia de diversos parámetros bioquímicos sanguíneos (bioquímica clínica) que sirven como biomarcadores de salud de los animales. Entre ellos se encuentran numerosas actividades enzimáticas plasmáticas, electrolitos, minerales, metabolitos y otros (glucosa, proteínas, lípidos), y su estudio combinado con los niveles de contaminantes permite evaluar e identificar los efectos adversos de esos contaminantes ambientales en la salud de las aves silvestres. Esto se llevó a cabo en el Capítulo IV, en el que encontramos que los valores medios globales obtenidos para muchos de los parámetros fueron similares a los descritos previamente en la bibliografía para cigüeñas blancas adultas y jóvenes (Jerzak *et al.*, 2010) y otras especies del mismo género (Han *et*



al. 2016), excepto para el Cl, ya que no se encontraron valores de referencia para la cigüeña blanca en la literatura, siendo nuestro trabajo el primero en establecerlos. Aunque existieron diferencias entre varios parámetros entre colonias de cría, no hubo un patrón general entre colonias y no se pudo establecer una relación clara, común y justificada entre los niveles de Cu, Pb, Cd, Hg y As y los valores de los distintos parámetros bioquímicos, aunque se encontraron algunas correlaciones significativas. Sería necesario ampliar este tipo de estudio a colonias en las que exista una clara contaminación ambiental por esos elementos químicos, como pudieran ser colonias establecidas en zonas mineras, para establecer mejor esas correlaciones entre elementos y parámetros bioquímicos de salud.

Para esta tesis doctoral se tomaron muestras de ejemplares procedentes de un centro de recuperación de fauna y de tres colonias situadas en distintas localizaciones de la provincia de Cáceres, con distintos gradientes de contaminación al estar situadas en distintos entornos con diferentes influencias humanas (cercanas a carretera, a vertederos, a zonas agrícolas, ganaderas o situadas en zonas más naturales, una ZEPA). En general, las concentraciones de As, Cu y Zn resultaron similares a las halladas en ciconiiformes en España (Baos *et al.*, 2006; Benito *et al.*, 1999; de la Casa-Resino *et al.*, 2014), aunque las concentraciones más elevadas de As se observaron en una colonia de cigüeña blanca cercana a una zona agrícola, lo que puede ser explicado porque los productos comerciales relacionados con la agricultura (insecticidas, herbicidas) son de las principales fuentes antropogénicas de As (Garland, 2007). En general, la colonia que presentó niveles más elevados de metales fue la colonia más cercana a zona agrícola intensiva y a vertedero, y los más bajos a la colonia situada en una zona ZEPA. Cuando se compararon el peso y estado de carnes de los pollos no se encontraron diferencias significativas entre las tres colonias, lo que se puede interpretar como que los distintos niveles de metales en la colonia pueden considerarse sin efecto en estos parámetros (Capítulo IV). Sabiendo que los metales y metaloides presentes en la sangre y tejidos de aves silvestres se deben principalmente a la ingestión de alimentos y agua contaminados (Binkowski y Sawicka-Kapusta, 2015; García-Fernández *et al.*, 1995; Orłowski *et al.*, 2012) en los estudios desarrollados se refuerza la importancia de la contaminación del hábitat en los niveles sanguíneos de metales (Capítulos I, II, III y IV).

Otros factores estudiados en esta tesis han sido la edad y el sexo de los animales y su relación con los distintos parámetros analizados. Se encontraron diferencias con relevancia estadística entre esos factores para el caso del Cr, debidas a diferencias significativas entre los pollos hembras (todos con valores < LD) y los machos adultos (la media más alta) (Capítulo I). A excepción de lo indicado anteriormente, la no existencia de diferencias estadísticamente significativas en función del sexo, sea en los niveles de elementos químicos o en los parámetros bioquímicos (Capítulos I y IV) puede estar relacionada con el hecho de que la cigüeña blanca es una especie monomórfica en la que machos y hembras presentan condición corporal, peso y comportamientos alimentarios semejantes, siendo conocido que gran parte de la carga contaminante de los elementos químicos estudiados es proveniente de la dieta (Berglund *et al.* 2009), por lo que es comprensible que no haya grandes diferencias entre sexos.



Al contrario del sexo, la edad sí se reveló como un factor influyente en los valores tanto de metales como de parámetros bioquímicos, como ha sido descrito anteriormente por otros autores (Campbell, 2012; Carneiro *et al.*, 2014; Jerzak *et al.*, 2010; Lucia *et al.*, 2010). Se esperaba que con el incremento de la edad las concentraciones de los contaminantes pudieran demostrar una tendencia creciente, y si bien se encontraron diferencias estadísticas significativas con la edad en los niveles de Ni, Cu, Se y Hg (que mostraron valores significativamente más elevados en adultos), en el caso del Pb los valores significativamente mayores se encontraron en los especímenes jóvenes de cigüeña blanca (Capítulo I).

También en los parámetros bioquímicos determinados se observaron diferencias en función de la edad, de tal manera que los pollos mostraron valores significativamente más altos en LDH, CPK, ALP, K, P y ácidos biliares, mientras que los adultos mostraron valores superiores de AST, AChE, Ca, Mg, colesterol, proteínas totales y albúmina, no existiendo diferencia por la edad en GGT, Cl, Na, glucosa, triglicéridos, ácido úrico y BUN. Por ello, el factor edad es importante tenerlo en cuenta de cara a la interpretación de estos parámetros fisiológicos cuando se está evaluando el estado de salud.

Están descritas en la bibliografía correlaciones entre las concentraciones de varios metales y aún entre oligoelementos, principalmente en órganos o tejidos animales, ya que en sangre hay menos información. Así, se han encontrado correlaciones positivas significativas entre Cd-Cu y Cd-Zn en sangre de búho real (*Bubo bubo*) (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011), y aunque el Zn y el Cu son metales esenciales y el Cd y el Hg son metales tóxicos, todos comparten respuestas biológicas “semejantes” (Blanco *et al.*, 2003), como el antagonismo a los cationes biológicos, participación en las reacciones redox, modulación de los elementos esenciales y de la homeostasis (Peixoto *et al.*, 2003), y se unen a las metalotioneínas. En esta tesis se encontraron varias correlaciones significativas entre metales siendo las más significativas entre los pares As-Hg (Capítulos I y III), As-Pb y Hg-Pb (Capítulo I), Fe-Zn y Hg-Se (Capítulo III). En mamíferos, está descrita una acumulación de Se en los tejidos expuestos al Hg como un efecto protector de la acción del Hg (Yang *et al.*, 2008) lo que puede explicar la correlación encontrada entre Hg-Se. En humanos también fueron descritas correlaciones sanguíneas positivas significativas entre As-Hg y As-Pb (Zeng *et al.*, 2019). Habrá que investigar más las relaciones encontradas entre metales, ya que en la bibliografía no están actualmente referidas las causas para estas relaciones.

Cada vez más, la Ecotoxicología, que tiene como recurso a especies bioindicadoras, como es la cigüeña blanca, debe ser una ciencia que con sus conocimientos permita desarrollar acciones preventivas y tener también un componente predictivo (Levengood y Beasley, 2007), para evitar la degradación de nuestro ambiente, fauna y flora.

El paso siguiente

Debido a la introducción de nuevas medidas restrictivas sobre elementos tóxicos con posterioridad a nuestro estudio, sería interesante la realización próximamente de un nuevo muestreo similar en la misma colonia dónde fue desarrollado el estudio para evaluar la



tendencia temporal de As, Hg, Cd y Pb (Capítulo III), para comprobar si esas restricciones, medidas y reglamentaciones han contribuido aún más a la reducción de los niveles ambientales de estos cuatro elementos químicos tóxicos. La medida posterior más reciente ha sido la establecida en el Convenio de Minamata sobre el Mercurio (<http://www.mercuryconvention.org/>) por parte del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), que entró globalmente en vigor en 2020 y, había sido aprobado en Ginebra en el año 2013.

En el futuro, también convendría continuar utilizando la cigüeña blanca como especie de biomonitorización, y la sangre como método no destructivo, no solo para el estudio de metales sino también ampliarlo a otros contaminantes orgánicos persistentes (plaguicidas, PCBs, PBDEs, perfluorados...) como ya se ha iniciado con alguno de ellos (de la Casa-Resino, 2014; Pérez-López *et al.*, 2016).

Por último, con el seguimiento de esta investigación, se podrá recurrir y validar la utilización de otras muestras no destructivas, principalmente plumas, en la investigación tanto de algunos metales que se quedan atrapados en el momento de formación de la pluma, como de contaminantes orgánicos persistentes. El recurso a la pluma podrá suponer, como ejemplo, una menor y/o más rápida manipulación de los pollos para la recogida de muestra, con los consiguientes beneficios que esto supone. Si bien están publicados diversos estudios que determinan los niveles de metales en plumas, habría que relacionarlos con valores en sangre en los mismos individuos algo que a día de hoy no se encuentra generalmente referenciado.

REFERENCIAS

- Baos R., Jovani R., Pastor N., Tella J.L., Jiménez B., Gómez G., González M.J., Hiraldo F. (2006). Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ. Toxicol. Chem.* 25: 2794–2803.
- Benito V., Devesa V., Muñoz O., Suner M.A., Montoro R., Baos R., Hiraldo F., Ferrer M., Fernandez M., Gonzalez, M.J. (1999). Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci. Total Environ.* 242: 309–323.
- Becker P.H. (2003). Biomonitoring with birds. En: Markert B.A, Breure A.M. Zechmeister H.G. (eds). *Trace Metals and Other Contaminants in the Environment*. Elsevier, pp. 677–736.
- Berglund Å.M., Koivula M., Eeva T. (2011). Species-and age-related variation in metal exposure and accumulation of two passerine bird species. *Environ. Pollut.* 159(10): 2368-2374.
- Binkowski T.J., Sawicka-Kapusta K. (2015). Lead poisoning and its in vivo biomarkers in Mallard and Coot from two hunting activity areas in Poland. *Chemosphere* 127: 101-108.
- Blanco G., Frias O., Jimenez B., Gomez G. (2003). Factors influencing variability and potential uptake routes of heavy metals in black kites exposed to emissions from a solid-waste incinerator. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(11): 2711-2718.



- Breckenridge R.P., Manguba M., Anderson P.J., Bartish T.M. (2002). Using biomonitoring data for stewardship of natural resources. En: Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton A., Cairns J. (eds). *Handbook of Ecotoxicology* (2nd ed). CRC Press Lewis Publishers, Washington DC, pp. 233-255.
- Burger J. (2008). Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci. Total Environ.* 389: 37–45.
- Campbell T.W. (2012). Clinical Chemistry of Birds. En: Thrall, M.A., Weiser, G. Allison, R.W (eds). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2nd ed.). John Wiley Sons, Inc, pp. 582–598.
- Carneiro M., Colaço B., Brandão, R., Ferreira, C., Santos, N., Soeiro, V., Colaço, A., Pires, M.J., Oliveira, P.A., Lavín, S. (2014). Biomonitoring of heavy metals (Cd, Hg, and Pb) and metalloid (As) with the Portuguese common buzzard (*Buteo buteo*). *Environ. Monit. Assess.* 186: 7011–7021.
- de la Casa-Resino, I. (2014). Nuevos horizontes en ecotoxicología: biomarcadores destructivos y no destructivos en codorniz (*Coturnix coturnix*) y cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*). Universidad de Extremadura. Recuperado el 15/01/2019 de <http://dehesa.unex.es/handle/10662/2284>.
- European Environment Agency (2019). Heavy metal emissions. Recuperado el 05/12/2020 de <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/eea32-heavy-metal-hm-emissions-1/assessment-10>.
- García Fernández A.J., Sánchez-García J.A., Jiménez-Montalbán P., Luna A. (1995). Lead and cadmium in wild birds in southeastern Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 14(12): 2049-2058.
- Gariboldi J.C., Bryan A.L., Jagoe C.H. (2001). Annual and regional variation in mercury concentrations in wood stork nestlings. *Environ. Toxicol. Chem.* 20(7): 1551-1556.
- Garland T. (2007). Arsenic. En: Gupta R.C. (ed). *Veterinary Toxicology* (2nd ed.). Academic Press, Oxford, pp. 418–421.
- Gil, F., Pla, A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21: 245–255.
- Gómez-Ramírez P., Martínez-López E., María-Mojica P., León-Ortega M., García-Fernández A.J. (2011). Blood lead levels and δ -ALAD inhibition in nestlings of Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) to assess lead exposure associated to an abandoned mining area. *Ecotoxicology* 20: 131–138.
- Han J.I., Jang H.J., Na K.J. (2016). Hematologic and serum biochemical reference intervals of the Oriental white stork (*Ciconia boyciana*) and the application of an automatic hematologic analyzer. *J. Vet. Sci.* 17: 399–406.
- Jerzak L., Sparks T.H., Kasprzak M., Bochenski M., Kaminski P., Wiśniewska E., Mroczkowski S., Tryjanowski, P. (2010). Blood chemistry in white stork *Ciconia ciconia* chicks varies by sex and age. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 156: 144–147.
- Levengood, J.M., Beasley, V.R. (2007). Principles of Ecotoxicology. En: Gupta R.C. (ed). *Veterinary Toxicology*. Academic Press, pp. 689–708.



- Lucia M., André J.M., Gontier K., Diot N., Veiga J., Davail S. (2010). Trace element concentrations (mercury, cadmium, copper, zinc, lead, aluminium, nickel, arsenic, and selenium) in some aquatic birds of the southwest Atlantic coast of France. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 844–853.
- Maceda-Veiga A., Figuerola J., Martínez-Silvestre A., Viscor G., Ferrari N., Pacheco M. (2015). Inside the redbox: applications of haematology in wildlife monitoring and ecosystem health assessment. *Sci. Total Environ.* 514: 322-332.
- Orłowski G., Kamiński P., Kasprzykowski Z., Zawada Z., Koim-Puchowska B., Szady-Grad M., Klawe J.J. (2012). Essential and nonessential elements in nestling rooks *Corvus frugilegus* from eastern Poland with a special emphasis on their high cadmium contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63: 601–611.
- Peixoto N.C., Roza T., Flores É.M., Pereira M.E. (2003). Effects of zinc and cadmium on HgCl₂- δ -ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol. Lett.* 146: 17–25
- Pérez-López M., De la Casa-Resino I., Hernández-Moreno D., Galeano J., Míguez-Santiyán M.P., de Castro-Lorenzo A., Otero-Filgueiras M., Rivas-López O., Soler F. (2016). Concentrations of metals, metalloids, and chlorinated pollutants in blood and plasma of White stork (*Ciconia ciconia*) nestlings from Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 71: 313–321.
- Yang D., Chen Y., Gunn J.M., Belzile N. (2008) Selenium and mercury in organisms: Interactions and mechanisms. *Environ. Rev.* 16(NA): 71-92
- Tsipoura N., Burger J., Feltes R., Yacabucci J., Mizrahi D., Jeitner C., Gochfeld M. (2008). Metal concentrations in three species of passerine birds breeding in the Hackensack Meadowlands of New Jersey. *Environ. Res.* 107: 218–228.
- Vanparys, C., Dauwe, T., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., Eens, M., 2008. Metallothioneins (MTs) and δ -aminolevulinic acid dehydratase (Δ -ALAD) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Sci. Total Environ.* 401: 184–193.
- Zeng, H. L., Li, H., Lu, J., Guan, Q., & Cheng, L. (2019). Assessment of 12 metals and metalloids in blood of general populations living in Wuhan of China by ICP-MS. *Biol. Trace Elem. Res.* 189(2): 344-353.

CONCLUSIONES GLOBALES





CONCLUSIONES GLOBALES

1. El estudio de la presencia de 12 elementos químicos en sangre de cigüeña blanca ha sido el primero reportado en la bibliografía científica en esta especie, y particularmente los niveles de Cr y Ni. Esto los hace importantes de cara a futuros programas de biomonitorización usando esta especie como bioindicador.
2. En dichos programas de biomonitorización conviene tener en cuenta la edad de los ejemplares en la interpretación de los datos, ya que se han encontrado algunas diferencias entre adultos y pollos, presentando estos últimos valores superiores de Pb, mientras que los adultos mostraron valores significativamente más elevados de Ni, Cu, Se y Hg en adultos de cigüeña blanca. Por el contrario, el factor sexo no influye significativamente para esta interpretación.
3. En la cigüeña blanca también existe, como en otros vertebrados, una importante correlación positiva entre los valores sanguíneos de Hg y Se en adultos, relacionada seguramente con la acción protectora del Se frente a la acción tóxica del Hg, por formación de un complejo estable entre ambos.
4. La actividad enzimática Δ -ALAD en sangre de la cigüeña blanca ha mostrado una alta sensibilidad a la exposición a diferentes niveles de Pb, con una inhibición dosis-dependiente. Esta sensibilidad es incluso mayor que en otras especies de aves, pudiendo establecerse una concentración de 30 $\mu\text{g/L}$ de Pb en sangre como umbral a partir del cual en la especie estudiada se produce inhibición significativa.
5. En esta especie, valores de Pb en sangre inferiores a 100 $\mu\text{g/L}$ no han afectado significativamente a la concentración de Hct y Hb, lo que demuestra que la determinación de Δ -ALAD (como biomarcador bioquímico) es más sensible a la exposición al Pb que la determinación del Hct o de la Hb (biomarcadores de efecto).
6. Se ha comprobado en sangre de pollos de cigüeña blanca una disminución muy significativa en los niveles de Pb y Hg, y evidente en los niveles medios de As, entre los años 1998/99 y 2008/09 que debe ser relacionada directamente con la implementación de normas legales sobre restricciones y regulaciones en la fabricación, uso y comercialización de estos elementos tóxicos.
7. Estos datos de evolución temporal deben ser usados en nuevos estudios de monitorización en la misma colonia para comprobar la eficacia de las nuevas medidas restrictivas sobre esos elementos implementadas tras la realización del presente estudio.



8. Se han establecido valores de referencia para 20 parámetros bioquímicos en plasma de cigüeña blanca, indicadores del estado de salud, comprobando la existencia de diferencias en función de la edad, con valores superiores de algunos parámetros en los pollos (LDH, CPK, ALP, K, P y ácidos biliares) y otros en los adultos (AChE, Ca, Mg, colesterol, proteínas totales y albumina) por los que la edad debe ser tenida en cuenta en la interpretación de los mismos. Sin embargo, el sexo no tiene influencia en ellos.
9. No se ha establecido una relación clara, común y justificada entre los niveles de metales (Pb, Cd, Hg y Cu) y As y los valores de los distintos parámetros bioquímicos plasmáticos en los pollos de distintas colonias, si bien sería interesante ampliar este estudio a colonias en las que exista una clara contaminación ambiental por esos elementos, como pudieran ser colonias establecidas en zonas mineras.
10. De forma global, se ha demostrado la aplicabilidad de la sangre como muestra no destructiva en estudios ecotoxicológicos. Así mismo, la cigüeña blanca ha demostrado ser una especie útil y sensible como bioindicadora de la contaminación por metales y metaloides en estudios de tendencias temporales y espaciales de dicha contaminación.

