

CONSECUENCIAS DE LA INTOXICACIÓN
POR PLOMO EN EL ALIMOCHE (*Neophron
percnopterus*): UNA APROXIMACIÓN
COMPARATIVA ENTRE POBLACIONES
INSULARES Y CONTINENTALES

Laura Gangoso¹, Pedro Álvarez Lloret², Alejandro Rodríguez
Navarro² y José Antonio Donázar¹

¹*Dpto. Biología Aplicada, Estación Biológica de Doñana, CSIC
Avda. M^a Luisa s/n Pabellón del Perú, 41013 Sevilla*

²*Dpto. Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada
Campus de Fuentenueva, 18002 Granada*

**CONSECUENCIAS DE LA INTOXICACIÓN POR PLOMO EN EL ALIMOCHE
(*Neophron percnopterus*): UNA APROXIMACIÓN COMPARATIVA ENTRE
POBLACIONES INSULARES Y CONTINENTALES**

Resumen

La intoxicación por plomo ha sido descrita en dieciocho especies de aves rapaces. El plomo es depositado en el medio a través de distintas actividades humanas y, aunque existen muchas formas de incorporación de este metal, en el caso de las rapaces, la principal vía es la ingestión de perdigones embebidos en piezas de caza no cobradas. Los efectos subletales del plomo son muy diversos, y rara vez han sido constatados en poblaciones silvestres. En este trabajo realizamos una aproximación amplia a estos efectos a través del análisis de sangre y hueso en dos poblaciones de alimoche, una población insular sedentaria y una población continental migradora, que presentan distinto grado de exposición a este metal.

La población insular presentó una mayor prevalencia de concentraciones elevadas de plomo en sangre, que fueron más altas durante el periodo cinegético en la isla. El examen de la morfología eritrocítica fue compatible con una respuesta eritropoyética ante la anemia inducida por intoxicación por plomo. Los huesos fueron analizados mediante espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), mostrando una mayor concentración de plomo en la población insular, la cual estuvo directamente relacionada con la edad de los individuos, manifestando la existencia de una exposición crónica. Las propiedades composicionales del hueso se vieron negativamente afectadas por este contaminante, disminuyendo el grado de mineralización en función de la concentración de plomo. Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia del papel que la intoxicación por plomo puede estar desempeñando sobre el declive de poblaciones amenazadas expuestas a este contaminante, y la necesidad de realizar mejores monitoreos dirigidos a evidenciar los efectos "silenciosos" del plomo y sus posibles interrelaciones con otros factores limitantes.

Introducción

El plomo es un metal pesado de gran persistencia ambiental, que puede ser incorporado al medio de múltiples formas, principalmente por actividades humanas de tipo industrial, minera y cinegética (Pattee, 1984). La intoxicación por plomo en aves ha sido puesta de manifiesto desde hace más de un siglo (Grinnell, 1894; Bellrose, 1959), siendo sus efectos tóxicos de sobra conocidos. Las intoxicaciones agudas por este metal (exposición a una alta concentración de plomo durante un periodo de tiempo corto) pueden causar la muerte de los individuos (Ramo et al., 1992; Mateo et al., 1998), mientras que la exposición crónica (exposición prolongada a concentraciones menores) puede tener efectos subletales diversos, afectando al éxito reproductor (Burger et al., 1986), comportamiento, respuesta inmune (Rocke y Samuel, 1991; Redig et al., 1991; Trust et al., 1990) y fisiología (Burger, 1995; Burger y Gochfeld, 1996; Mateo et al., 1997; Fair y Ricklefs, 2002). La suma de los efectos a nivel de individuo puede resultar, como es lógico, en declives de las poblaciones afectadas, lo que puede llegar a ser grave en el caso de especies amenazadas (García-Fernández et al., 2005).

La mayoría de los estudios sobre los efectos del plomo en aves se han centrado en el grupo de las acuáticas, ya que presentan una alta predisposición a la intoxicación, debido a la incorporación de plomo a través de la ingestión de perdigones depositados en ambientes sujetos a alta presión cinegética (Mateo, 1998). La elevada mortalidad de aves acuáticas a consecuencia del plomo, (en Estados Unidos estimada en 1.6-2.4 millones de aves anualmente, Bellrose, 1959, Friend, 1987), llevó incluso a modificar la legislación existente en muchos países (Mateo, 1998), prohibiéndose en España el uso y tenencia de este tipo de munición en zonas húmedas Ramsar (Real Decreto 581/2001). Las rapaces (Falconiformes), situadas en la cúspide de las cadenas tróficas, son el segundo grupo en importancia afectado por este contaminante (Burger, 1995). Aunque existe una diferente exposición en relación con sus hábitos alimenticios y la probabilidad de ingestión de plomo (Mateo et al., 2003) así como una diferente susceptibilidad a sus efectos (Custer et al., 1984; Beyer et al., 1988), la intoxicación letal por plomo se ha descrito en 18 especies de rapaces silvestres (Pain et al., 2005), tanto predatoras (p.e. águila

imperial ibérica *Aquila adalberti*, Hernández, 1995; Mateo et al., 2001), como carroñeras (buitre leonado *Gyps fulvus*, Mateo et al., 1997a).

La intoxicación por plomo ha sido identificada como una de las principales amenazas para especies como los pigargos americano (*Haliaeetus leucocephalus*) o europeo (*H. albicilla*) (Franson, 1996, Kenntner et al., 2001), o el cóndor de California (*Gymnogyps californianus*), Wiemeyer et al., 1986, 1988) cuyo declive y recuperación están íntimamente relacionados con este contaminante (Behrens y Brooks, 2000). No obstante, los estudios acerca de efectos de la intoxicación por plomo en aves de presa han estado tradicionalmente limitados a aspectos descriptivos y son escasos los trabajos que hayan podido abordar en profundidad esta problemática entre rapaces silvestres (Mateo et al., 1999; Margalida y Heredia, 2005; Pain et al., 2005), y mucho menos aún, ahondar en las consecuencias a nivel individual (Blanco et al., 2004) y los efectos ecológicos de la intoxicación por plomo. Una aproximación más compleja y, por tanto, de mayor interés, resulta particularmente difícil, ya que en la práctica totalidad de los casos se trata de especies con pequeños tamaños poblacionales y amenazadas, lo que, por un lado, dificulta su captura para la obtención de muestras, y por otro lado, imposibilita llevar a cabo estudios de tipo experimental o aquellos que impliquen el sacrificio del animal.

La incorporación de este metal en rapaces puede producirse a través de distintas formas (Harrison, 1986; Mateo, 1998), pero multitud de trabajos evidencian que la principal vía de entrada del plomo es la ingestión total o parcial de presas de caza no cobradas, conteniendo esquirlas de plomo en su interior (Redig et al., 1980; Mateo, 1998; Pattee y Hennes, 1983; García-Fernández et al., 1997, Clark y Scheuhammer, 2003; Pain et al., 2005). Aunque las esquirlas pueden ser regurgitadas en las egagrópilas, su ingestión repetida puede producir intoxicación aguda (Pattee et al., 1981; Mateo et al., 2001), ya que parte de éstas son disueltas por los jugos gástricos en el estómago (pH en ventrículo= 1-1.2 en la mayoría de las aves de presa). Una vez absorbido, el plomo pasa rápidamente a diversos tejidos y órganos, principalmente sangre, hígado, riñones y hueso. Mientras que el plomo en los tejidos blandos tiene una tasa de recambio de semanas o meses, es retenido en el hueso durante años, reflejando una intoxicación de tipo reciente o crónica, respectivamente (Scheuhammer, 1987; Pain et al., 2005).

Existen distintos métodos para evaluar la exposición al plomo. Una de las técnicas más habituales en rapaces es el análisis de egagrópilas, el cual nos permite determinar la presencia de plomo en la población estudiada, así como la frecuencia de exposición, estacionalidad y presas asociadas (Mateo, 1998). A nivel individual, la presencia de este metal puede ser directamente medida en la sangre, localizándose principalmente en los eritrocitos (>90%). Así, se considera que concentraciones >0.2 µg/ml en sangre son indicativas de exposición anormal, mientras que niveles superiores a 0.5 µg/ml son diagnósticos de plumbismo (LaBonde, 1995; Mateo, 1998). El examen hematológico permite obtener evidencias tanto de la exposición como de los efectos que el plomo ejerce sobre los organismos. La exposición prolongada al plomo inhibe la síntesis de precursores de la hemoglobina, causando anemia y acumulación de ácido delta aminolevulínico (d-ALA) en la sangre y orina, reduciendo también la vida media de los eritrocitos (Goyer, 1996; Mateo, 1998). La anemia regenerativa inducida por el plomo está asociada a una marcada respuesta eritropoyética, por lo que mediante el análisis de frotis se puede detectar un incremento en el número de eritrocitos inmaduros, policromáticos e hipocrómicos (Goyer, 1996; Campbell, 1994). En individuos muertos recientemente se puede recurrir al análisis de órganos como el hígado o los riñones, pero esta circunstancia se produce rara vez en poblaciones silvestres, por lo que el análisis de huesos se convierte en el método más eficaz y, además, el único que nos permite evaluar la exposición a largo plazo.

El hueso es un tejido calcificado metabólicamente activo, que se encuentra en continua remodelación (Lowenstam, 1981; Boskey, 1999; Miller et al., 2001). La mineralización está regulada por una serie de procesos complejos, que pueden ser alterados por factores de tipo endocrino (Bohannon et al., 2000), genético o ambiental (Glimcher, 1998; Andrews, 1989; Lind et al., 1999). Recientes estudios han puesto de manifiesto que ciertos contaminantes ambientales, como los metales pesados, pueden afectar directamente a la tasa de renovación del hueso, mediante la alteración de la actividad de osteoblastos y osteoclastos (Pounds et al., 1991; Lundholm, 1995; Kanti y Smith, 1997; Schirmacher et al., 1998; Berglund et al., 2000). El ión Pb^{++} actúa como un análogo del ión Ca^{++} , compitiendo con él y sustituyéndolo con gran afinidad en el tejido óseo (Ehle, 1993; Scheuhammer, 1987). El plomo se acumula en el hueso durante toda la vida del individuo (Pain, 1996),

llegando a suponer el 84-90% del total de plomo presente en el organismo (García-Fernández et al., 1997). Acorde con los datos revisados, niveles en hueso $>10-20$ $\mu\text{g/g}$ se consideran elevados (intoxicación subclínica), mientras que niveles >20 $\mu\text{g/g}$ son compatibles con intoxicación letal (Mateo et al., 2003). En general, las hembras acumulan mayores niveles de Pb en hueso que los machos. Así mismo, las hembras reproductoras pueden acumular 4-5 veces más Pb que las no reproductoras (Finley y Dieter, 1978). Esta mayor acumulación está relacionada con el aumento en la tasa de renovación del calcio esquelético, necesario para la formación de la cáscara de huevo durante la reproducción (Taylor, 1970).

En este trabajo se analiza la exposición y los posibles efectos negativos del plomo en una población insular de alimoche (*Neophron percnopterus*), contrastando los patrones observados con poblaciones continentales de la misma especie, mediante la determinación toxicológica de los niveles de plomo y sus efectos en diversos tejidos. Nuestra hipótesis principal es que determinadas adaptaciones insulares, como el sedentarismo, pueden ocasionar diferencias entre poblaciones en cuanto a la exposición y los efectos negativos de los contaminantes. A partir de aquí, si el sedentarismo conlleva una mayor exposición al plomo, podemos predecir que: (a) la frecuencia de aparición de esquirlas de plomo en egagrópillas será mayor en esta población que en la continental, (b) las intoxicaciones de tipo agudo reflejadas en el análisis de sangre, serán más frecuentes que en la población continental (c) los niveles de plomo en hueso, indicativos de exposición crónica, serán más elevados en la población canaria, y si esto es así, (d) esperamos encontrar, por tanto, un efecto de bioacumulación en el hueso, que se verá reflejado en una relación positiva de la concentración de Pb con la edad. Por todo lo anterior, la intoxicación por plomo tendrá efectos negativos sobre los individuos más afectados, de modo que a nivel individual esperamos encontrar: (e) una relación negativa entre la concentración de plomo y el grado de mineralización de los huesos. Dentro de la población canaria, (g) la exposición al plomo se verá reflejada en alteraciones de los parámetros sanguíneos que indican respuesta ante una anemia regenerativa inducida por este contaminante.

Material y métodos

Área y poblaciones de estudio

Para testar nuestras predicciones se realizó un estudio comparativo entre distintas poblaciones de alimoche, una población insular y una población continental, las cuales difieren ampliamente en cuanto a su grado de exposición al plomo. Dentro de la población continental se incluyen individuos procedentes de Cádiz, Valle del Ebro y Segovia. A diferencia de la población insular, Las poblaciones peninsulares son migradoras, localizándose sus cuarteles de invernada en la zona del Sahel en el continente africano (Cramp y Simmons, 1980). La población de alimoches de Cádiz (9,500 Km²) mantiene aproximadamente 30 parejas reproductoras. Esta población apenas depende de los muladares tradicionales, sino que los individuos se alimentan mayoritariamente de carcasas de ganado extensivo y presas silvestres, principalmente conejo y palomas, como pone de manifiesto el examen del contenido de egagrópilas y presas encontradas en los nidos (Benítez et al., 2003). En el Valle del Ebro, (provincias de Zaragoza, Navarra y Huesca, 100 parejas, 12,400 Km²) los alimoches consumen principalmente carcasas de ganado en muladares, presas silvestres, y restos de ganado doméstico y basuras en vertederos (Donázar, 1993, autores, no publicado). La población de Segovia (25 parejas) se alimenta fundamentalmente en muladares, donde se depositan mayoritariamente carcasas de cerdos, aunque también consume presas silvestres, especialmente palomas, y visita con regularidad vertederos de residuos humanos (autores, no publicado). Las poblaciones peninsulares permanecen en las distintas áreas de reproducción entre los meses de marzo-septiembre (del Hoyo et al., 1994), y por tanto, su presencia no se solapa con la temporada cinegética en España, la cual comienza en otoño-invierno, finalizando en los meses de enero-febrero, justo antes de la migración prenupcial de los alimoches. No obstante, en el período comprendido desde mediados de agosto hasta septiembre tiene lugar en la península lo que se conoce como media veda, durante la cual se cazan conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y tórtolas (*Streptopelia turtur*) con escopeta. La intoxicación por plomo no ha sido descrita en las zonas de invernada africanas, y se ha sugerido que ésta debe ser baja (Mateo et al., 1999).

La población de alimoches de Fuerteventura (30 parejas, 1,662 Km²) es sedentaria (Cramp y Simmons, 1980; Donázar et al., 2002b). El estudio de la alimentación realizado, muestra que la dieta consiste mayoritariamente en carcasas de presas silvestres, sobre todo conejo y paloma, y carcasas de cabra doméstica y semi-silvestre (Medina, 1999; Gangoso et al., 2005). La isla de Fuerteventura soporta una alta presión cinegética. Prácticamente toda la superficie insular (excepto las zonas urbanas) es coto de caza. Las especies cinegéticas son: conejo, Perdiz moruna (*Alectoris barbara*), Ardilla moruna (*Atlantoxerus getulus*), codorniz (*Coturnix coturnix*), paloma bravía y recientemente los gatos asilvestrados (Dpto. de Caza. Consejería de Medio Ambiente, Caza, Seguridad y Emergencias del Cabildo de Fuerteventura). El número de licencias de caza fue de 1,984 en 2005, a las que habría que sumar el aproximadamente centenar de cazadores que llegan a Fuerteventura procedentes de otras islas. La temporada cinegética tiene una duración de 13-14 días (sólo domingos), y generalmente tiene lugar en los meses de agosto a noviembre.

Métodos

Para determinar inicialmente la exposición al plomo de las poblaciones de alimoche se recogieron un total de 751 egagrópilas en los dormitorios comunales de la especie (424 egagrópilas en Fuerteventura en el año 2000 y 327 en el Valle del Ebro en el periodo 1999-2003). Las egagrópilas fueron separadas individualmente con una envoltura de papel de aluminio y analizadas mediante rayos X. Aquellas que presentaron esquirlas en su interior fueron diseccionadas y examinadas con lupa binocular, para determinar el tipo de presa asociada.

Durante el periodo 1999-2005 se obtuvieron 137 muestras de sangre de alimoches canarios, tanto de pollos volantones (N=61) como de individuos de otras edades capturados con redes cañón (N=76). Adicionalmente se tomaron 32 muestras de individuos continentales inmaduros y adultos (10 individuos de Aragón en 2002, 19 de Segovia en 2003-2004 y 3 de Cádiz en 2003). De cada individuo se extrajo una pequeña cantidad de sangre (1 ml) de la vena braquial, siendo almacenadas en tubos de heparina-litio e inmediatamente congeladas a -20°C. Finalmente, de cada individuo se obtuvieron dos frotis, los cuales fueron fijados 3 min. en metanol y teñidos con May-Grünwald Giemsa. De estos, se seleccionaron 64 individuos de la

población canaria para la determinación de distintos parámetros hematológicos: porcentaje de policromasia, presencia y porcentaje de eritrocitos inmaduros, hipocrómicos, fusiformes y existencia de anomalías nucleares.

Las muestras de hueso se extrajeron de 39 alimoches recogidos como cadáveres entre los años 1999 y 2004. De entre estos, 28 procedían de Fuerteventura, 6 de Navarra y 5 de Cádiz. La edad se conocía en 16 ejemplares canarios, y en todos los individuos continentales. La edad y el sexo se conocía en 14 ejemplares canarios, 3 navarros, y 2 procedentes de Cádiz. El húmero (derecho 66.7% de los casos, o izquierdo 33.3%) de cada individuo fue extraído, medido y pesado tras retirar con un bisturí cualquier resto de músculo adherido. Posteriormente, de cada húmero se obtuvo un fragmento de aproximadamente 2 cm de la diáfisis. Seguidamente se procedió a la sección de pequeños fragmentos circulares del mismo. Las secciones obtenidas fueron lavadas repetidamente en agua destilada para eliminar posibles restos de la disección y corte. Finalmente, las muestras fueron criomolidas (Freezer/Mill, SPEX) para su posterior análisis (Savannah River Ecology Laboratory, University of Georgia).

Análisis de laboratorio

Exposición reciente.

El análisis de los niveles de plomo en sangre se realizó siguiendo a Benito et al. (1999). Tras el tratamiento previo de las muestras, la concentración de Pb se determinó en horno de grafito y absorción atómica con efecto Zeeman. Las concentraciones en $\mu\text{g/L}$ (ppb) son el resultado de la media de 3 replicados. Adicionalmente, se procesó por triplicado una muestra de referencia de sangre bovina CRM 196 con una media (SD) de 772 (11) ng/ml, resultando en 767 (8) ng/ml, con una RSD del 1.04%. De acuerdo con las normas de uso, el resultado es aceptable al entrar en el intervalo de la media \pm 2SD (el 95% de los laboratorios que han participado en análisis de la muestra certificada). El límite de detección para el Pb fue de 0.06 g/l.

Exposición crónica.

Para determinar el efecto de la contaminación por plomo en la mineralización del hueso de los alimoches, se llevó a cabo un estudio en colaboración

con Alejandro Rodríguez Navarro y Pedro Álvarez Lloret (Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada). Para realizar dicha aproximación se empleó la espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), habitualmente utilizada para la caracterización del hueso (Rey et al., 1991; Smith y Rehman, 1995; Peters et al., 2000; Miller et al., 2001; Ou-Yang, 2001).

La cantidad de plomo contenido en los huesos se analizó mediante ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) y absorción atómica en horno de grafito. Las muestras fueron preparadas previamente, sometiendo 50 mg de hueso molido a un ataque químico con 1 ml de ácido nítrico (HNO_3) al 70% y posteriormente a un nuevo ataque con 1 ml de peróxido de nitrógeno (H_2O_2) al 30%. Se digirieron en microondas y finalmente se llevó la disolución hasta 10 ml con agua ultrapura. Para los análisis se empleó un equipo Elan 600 ICP-MS (Perkin Elmer).

Para determinar la composición química del hueso se emplearon análisis de espectrometría infrarroja (FTIR). Para ello se mezclaron y homogeneizaron 5 mg de muestra de hueso en polvo y 90 mg de KBr. Las pastillas se obtuvieron bajo presión de 10 Tn métricas durante 10 minutos. Los espectros de infrarrojo se registraron usando un espectrómetro de FTIR modelo Magna IR200 Nicolet con detector de LiTaO_3 . Los espectros se recogieron en modo absorbancia entre las frecuencias 400 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} y un total de 128 escaneados por muestra (3730 puntos de muestreo). Se utilizó una pastilla de referencia con composición constante (95 mg de BrK) para corregir el fondo de los espectros obtenidos de las muestras de hueso.

Las diferentes cantidades de fosfato, carbonato y colágeno en las muestras de hueso se determinaron a partir del área de los picos de las bandas de absorción asociadas a enlaces de grupos carbonato, fosfato, amida y C-H alifático en el espectro de infrarrojo. La integración y cálculo de las áreas se realizó con la ayuda del paquete informático EZ-OMNIC® y PeakFIT®. La deconvolución de los picos que presentaban solapamiento entre áreas se resolvió mediante el cálculo de la segunda derivada de las funciones. Este método permite un mejor y más detallado análisis cuantitativo del espectro. El grado de mineralización del hueso se obtuvo como:
Mineralización (%) = $\frac{\text{fosfato mineral (PO}_4 \text{ área banda } 900\text{-}1200 \text{ cm}^{-1})}{\text{colágeno (amida I área banda } 1660 \text{ cm}^{-1})}$

Análisis estadísticos

Las concentraciones de plomo, tanto en sangre como en hueso no estuvieron normalmente distribuidas (Shapiro-Wilk, $p < 0.001$), por lo que esta variable fue normalizada en ambos casos mediante transformación logarítmica de [Pb+1].

Pb en sangre

Para determinar la relación entre la concentración de plomo en sangre y la actividad cinética en Fuerteventura, realizamos un análisis de la varianza univariante, considerando la concentración de Pb en los individuos capturados como variable respuesta. Los factores correspondientes a la época de captura: temporada de caza (1) o fuera de ella (0); sexo: hembra (1) o macho (2); y la edad de los individuos (variable entre 1 y 6 años incluyendo la última categoría a los individuos adultos de edad desconocida). Las posibles interacciones fueron consideradas en el modelo.

La relación entre los parámetros hematológicos correspondientes al porcentaje de policromasia, prevalencia de inmaduros y la concentración de plomo, fue examinada mediante correlaciones no paramétricas de Spearman (pruebas de dos colas). La variación de la concentración de plomo en sangre entre individuos que presentaron eritrocitos inmaduros, fusiformes e hipocrómicos y los que no, fue examinada mediante análisis de la varianza (ANOVA).

Pb en hueso

Para determinar si existían diferencias en la concentración de plomo en hueso entre poblaciones realizamos un primer análisis de la varianza (ANOVA) considerando todo el conjunto de individuos, incluyendo la población canaria (1) o continental (0), el sexo hembras (1) o machos (2) y la edad (1-6) como factores. Posteriormente, realizamos un segundo ANOVA similar al anterior pero sólo para los individuos adultos (≥ 5 años). El efecto de la edad sobre la concentración de plomo sólo se analizó para la población canaria, ya que todos los ejemplares continentales de edad conocida eran adultos ($N=10$), salvo uno de tres años de edad. Para determinar la existencia de un efecto de bioacumulación realizamos un análisis de la varianza univariante, considerando la concentración de Pb en hueso como variable respuesta. Los factores correspondientes a la edad (1-6) y sexo, así como sus posibles interacciones fueron considerados en el modelo. Posteriormente,

examinamos la relación de la concentración de plomo en hueso con la edad de los individuos mediante correlación de Pearson (prueba de una cola).

La normalidad de la variable "grado de mineralización" fue explorada mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p=0.245$). Las relaciones del grado de mineralización con las características poblacionales e individuales fueron examinadas mediante un análisis de la varianza univariante, donde se incluyó la población (canaria (1) o peninsular (0)), el sexo (hembra (1) o macho (2)) y la edad (1-6) como factores. La concentración de plomo se incluyó como una covariable.

El efecto del plomo sobre las propiedades composicionales del hueso, concretamente el grado de mineralización, fue analizado mediante correlaciones bivariadas (pruebas de una cola).

Resultados

El análisis de egagrópilas mostró que el grado de exposición al plomo a través de la ingestión de perdigones de caza fue claramente mayor en el caso de la población canaria. Se encontraron esquirlas en 21 de las egagrópilas recogidas en Fuerteventura (5%, $N=424$) (Donázar et al., 2002b), mientras que en ninguna de las egagrópilas examinadas en el continente ($N=327$) se detectó la presencia de esquirlas de plomo.

Pb en sangre

La frecuencia de individuos con concentraciones de plomo en sangre indicativa de intoxicación aguda ($>200 \mu\text{g/L}$) fue mayor en la población canaria que en el resto de poblaciones consideradas (Tabla I). Dentro de las poblaciones continentales, sólo un alimoche procedente de Segovia presentó concentraciones indicativas de exposición anormal ($217.30 \mu\text{g/L}$), mientras que en la población canaria 12 ejemplares mostraron niveles superiores a $200 \mu\text{g/L}$, y 4 de ellos concentraciones superiores a los $500 \mu\text{g/L}$. Uno de estos ejemplares, capturado en septiembre del año 2000, presentó una concentración de $1,780 \mu\text{g/L}$. El porcentaje de individuos con concentraciones de plomo en sangre elevadas ($>100\text{-}200 \mu\text{g/L}$), fue significativamente mayor en la población peninsular que en la canaria (Probabilidad exacta de Fisher, $p=0.027$).

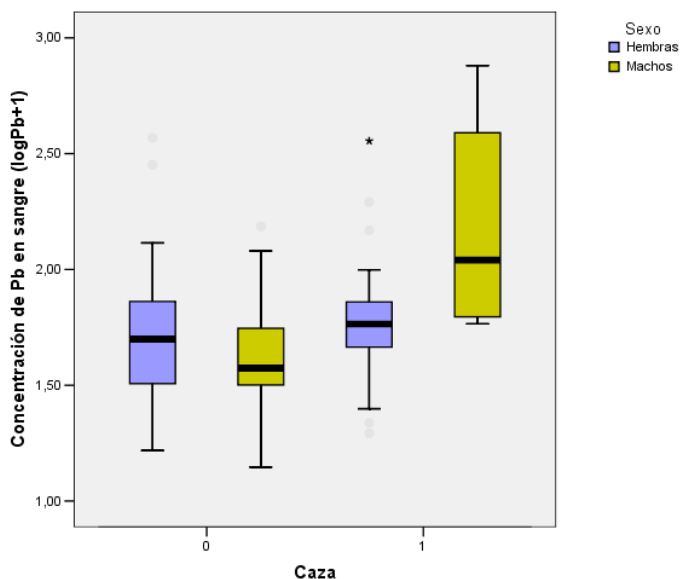
Tabla I. Número de individuos y frecuencia (%) en cada una de las categorías establecidas para la concentración de Pb en sangre en todas las poblaciones estudiadas. Niveles >200 µg/L (ppb) son indicativos de intoxicación aguda.

Población	N	<100 µg/L	>100-200 µg/L	>200 µg/L
Fuerteventura	137	113 (82.48)	11 (8.03)	12 (8.76)
Cádiz	3	3 (100)	0	0
Segovia	19	14 (73.68)	4 (21.05)	1 (5.26)
Valle del Ebro	10	7 (70.00)	3 (30.00)	0
Península Ibérica	32	24 (75.00)	7(21.88)	1(3.13)

El análisis de la varianza univariante realizado para determinar la variación de la concentración de plomo en sangre entre individuos capturados en Fuerteventura dentro (media geométrica=1.89, D.S=0.38, N=39) y fuera (media geométrica=1.66, D.S=0.31, N=36) de la temporada de caza mostró que los niveles de plomo fueron significativamente mayores durante la temporada cinegética en la isla ($F_{1,71}=14.30$, $p<0.001$), y difirieron significativamente entre sexos ($F_{1,71}=4.41$, $p=0.041$) siendo mayores para los machos (media geométrica=1.1.89, D.S=0.45, N=25) frente a las hembras (media geométrica=1.72, D.S=0.30, N=50) (ver Fig 1). Además, la interacción entre ambas variables fue significativa, indicando que los machos en temporada de caza presentaron los niveles más altos de plomo ($F_{1,71}=9.53$, $p=0.003$). La edad y sus posibles interacciones no tuvieron efectos significativos ($p>0.05$ en todos los casos).

Fig.1.

Gráfico correspondiente a la diferencia de concentración de plomo en sangre entre individuos capturados dentro (1) y fuera (0) de la temporada de caza en Fuerteventura.



Pb en hueso

Sólo un individuo presentó concentraciones de plomo en hueso compatible con intoxicación letal (>20 µg/g) (Fig.2). Se trataba de un ejemplar de Canarias de tres años de edad (Tabla 2). Cuando se consideraron todas las clases de edad, las concentraciones de plomo no difirieron significativamente entre la población peninsular (media geométrica=0.76, DS=0.24, N=11) y la canaria (media geométrica=0.77, DS=0.30, N=28) (ANOVA, $F_{1,37}=0.21$, $p=0.65$), mientras que la edad si tuvo un efecto significativo (ANOVA, $F_{5,22}=4.85$, $p=0.004$) (Tabla III) . Al comparar sólo individuos adultos (>5 años), la concentración de plomo fue significativamente mayor en la población canaria (media geométrica=0.89, DS=0.18, N=11) que en la peninsular (media geométrica=0.72, DS=0.18, N=10) (ANOVA, $F_{1,19}=4.5$, $p=0.04$) (Fig. 3). El sexo no tuvo efecto significativo en ninguno de los análisis.

Tabla II. Número de individuos y frecuencia (%) en cada una de las categorías establecidas para la concentración de Pb en hueso (peso seco). Niveles >10-20 µg/g son indicativos de exposición anormal, niveles >20 µg/g son compatibles con intoxicación letal.

Población	N	<10 µg/g	>10-20 µg/g	>20 µg/g
Islas Canarias	28	21 (75)	6 (21.43)	1 (3.57)
Península Ibérica	11	9 (81.81)	2 (18.18)	0

Fig. 2. Concentración de plomo en hueso (µg/g) y frecuencia de individuos en las poblaciones canaria (N=28) y peninsular (N=11).

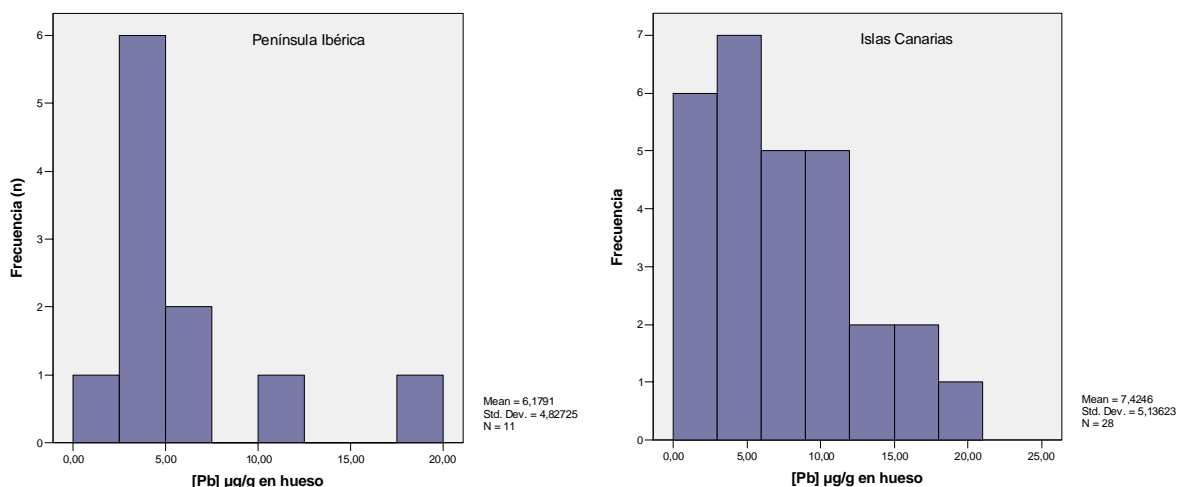


Fig.3. Gráficos correspondientes a las concentraciones de plomo en hueso ($\mu\text{g/g}$) entre poblaciones para todas las clases de edad (izquierda ANOVA, $F_{1,37}=0.21$, $p=0.65$) y sólo para individuos adultos (derecha ANOVA, $F_{1,19}=4.5$, $p=0.04$).

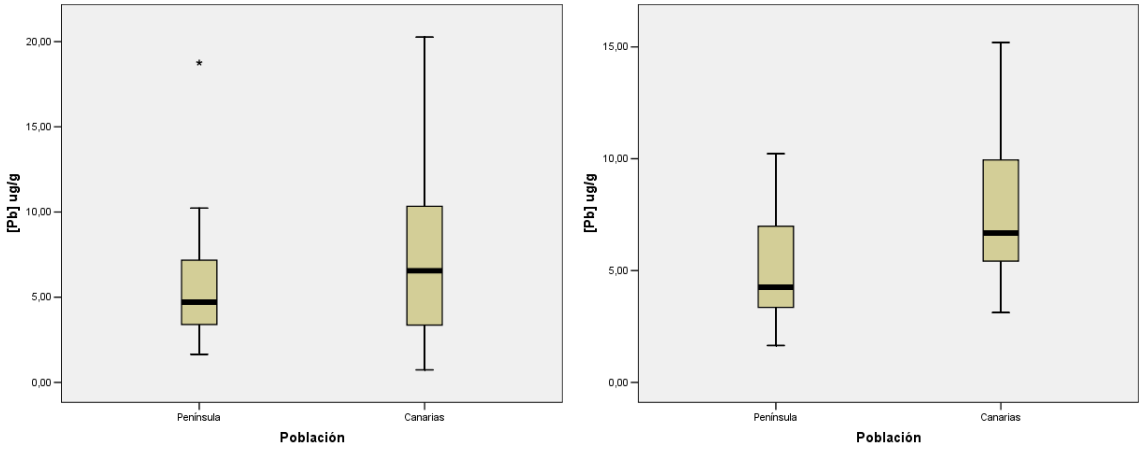


Tabla III. Media geométrica de la concentración de plomo en hueso ($\log [Pb+1]$) según la edad para el conjunto de individuos en ambas poblaciones (individuos de edad >5 se consideran adultos).

Edad	Media	N	DS	Media geométrica
1	0.2398	1	.	0.2398
2	0.5293	2	0.35865	0.4646
3	1.3116	2	0.02250	1.3115
4	0.6075	2	0.27350	0.5759
5	0.7668	2	0.14619	0.7598
6	0.8325	19	0.20475	0.8070
Total	0.8031	28	0.27621	0.7475

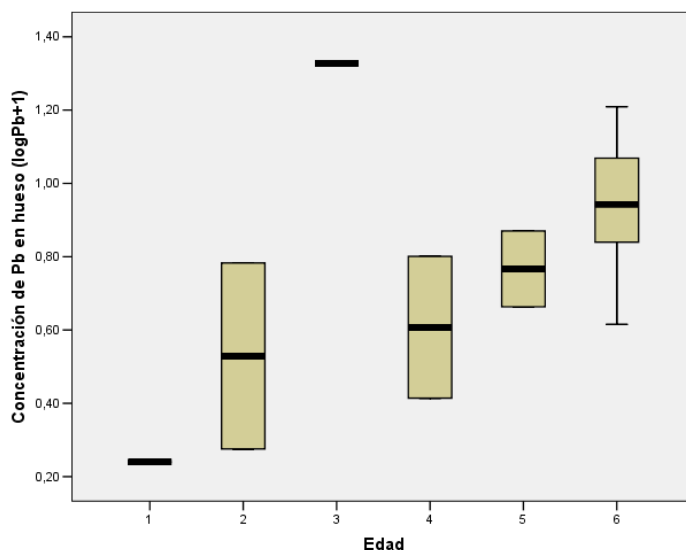
En el análisis de la varianza univariante realizado para examinar la variabilidad de la concentración de plomo en el hueso dentro de la población canaria, sólo la edad tuvo un efecto significativo en el modelo (ANOVA $F_{5,11}=4.418$, $p=0.019$,

N=17) (Tabla IV), indicando un efecto de bioacumulación con el paso del tiempo (Fig 4). La correlación entre ambas variables fue positiva (r Pearson=0.538, $p=0.013$, N=17). Un individuo de tres años de edad presentó la concentración de plomo en hueso más elevada, lo cual puede ser compatible con una intoxicación de tipo agudo. La concentración de plomo en hueso no difirió significativamente entre sexos.

Tabla IV. Media geométrica de la concentración de plomo en hueso ($\log [Pb+1]$) según la edad en la población canaria (individuos de edad ≥ 5 se consideran adultos).

Edad	Media	N	DS	Media geométrica
1	0.2398	1	.	0.2398
2	0.5293	2	0.35865	0.4646
3	1.3275	1	.	1.3275
4	0.6075	2	0.27350	0.5759
5	0.7668	2	0.14619	0.7598
6	0.9378	9	0.18190	0.9210
Total	0.8126	17	0.30338	0.7421

Fig. 4. Efecto de bioacumulación de la concentración de Pb en hueso con la edad en individuos de Canarias (r Pearson=0.538, $p=0.013$, N=17).



En el análisis de la varianza univariante realizado para examinar las relaciones del grado de mineralización con las características poblacionales e individuales, ninguno de los factores ni sus interacciones tuvo efectos significativos. En la determinación de los efectos del plomo sobre las propiedades composicionales del hueso, cuando se consideró el conjunto de los individuos pertenecientes a ambas poblaciones, encontramos una correlación negativa entre el grado de mineralización y la concentración de plomo en este tejido (r Pearson=-0.30, $p=0.032$, $N=39$). Cuando se analizó sólo la fracción adulta de ambas poblaciones, el efecto fue claramente más acusado (r Pearson=-0.63, $p=0.001$, $N=20$).

Efectos clínicos

En los individuos de la población canaria en los que se examinaron los parámetros hematológicos ($N=64$), se encontraron porcentajes de policromasia muy elevados (rango 7-58%). Se encontraron eritrocitos inmaduros en 16 individuos (25.0%, prevalencia de inmaduros rango 3-16%) y eritrocitos hipocrómicos en 22 ejemplares (34.37%). La concentración de plomo se correlacionó positivamente con la prevalencia de eritrocitos inmaduros (Spearman $\rho=0.399$, $p<0.001$, $N=64$) pero no con el porcentaje de policromasia (Spearman $\rho=0.036$, $p=0.80$, $N=51$). La concentración de plomo de los individuos que presentaron eritrocitos inmaduros (media geométrica=2.11, $DS=0.57$, $N=16$) fue significativamente mayor que la hallada para los individuos que no los presentaron (media geométrica=1.66, $DS=0.30$, $N=43$) (ANOVA $F_{1,57}=18.42$, $p<0.001$), mientras que la concentración de plomo no difirió significativamente entre los individuos con y sin eritrocitos hipocrómicos ($p>0.05$).

Los eritrocitos de tipo "abalonado" se encontraron en un alto porcentaje de individuos (42.19%, $N=27$), siendo la concentración de plomo mayor en dichos individuos, aunque no significativamente. Finalmente, en 2 ejemplares (3.13%) se detectaron anomalías nucleares consistentes en daños en la estructura general del núcleo (cariorisis).

Discusión

Este estudio demuestra a través de una aproximación múltiple, que la población canaria de alimoche presenta una elevada y continuada exposición al

plomo, debido a la ingestión de presas de caza conteniendo perdigones en su interior, siendo esta exposición mayor que la encontrada para las poblaciones continentales. Los análisis de egagrópilas muestran claramente que la vía de ingestión de plomo son las piezas de caza no cobradas y que la probabilidad de ingestión de este metal por este tipo de vía es considerablemente mayor en Canarias que en la Península Ibérica. El carácter sedentario de la población insular de alimoche incrementa la probabilidad de ingestión de perdigones de plomo (Donázar et al., 2002b), al coincidir temporalmente cada año con el periodo cinegético en la isla. Además, la reciente inclusión de especies como la Ardilla moruna o el gato asilvestrado en la lista de especies cinegéticas de Fuerteventura, hace que aumente la disponibilidad de presas con perdigones embebidos en su interior, ya que dichas especies son directamente abandonadas en el campo tras ser disparadas, sin que hasta el momento exista ningún tipo de legislación o control sobre el abandono de estos cadáveres en el medio.

Consecuentemente con todo lo anterior, los niveles de plomo en los individuos canarios son mucho más elevados dentro del periodo cinegético que fuera de él. A este respecto, resulta interesante la diferente concentración de plomo encontrada entre sexos. Según nuestros resultados, los individuos machos tienen niveles de plomo superiores a los de las hembras durante el período cinegético. Esto podría estar relacionado con diferencias comportamentales entre sexos en la búsqueda de alimento. De hecho, las observaciones realizadas periódicamente en el muladar de Fuerteventura evidencian que este punto de alimentación es visitado preferentemente por las hembras. Además, en los trampeos realizados con redes cañón cebadas con carcasas de ungulados domésticos en la isla, la mayoría de los individuos capturados y recapturados posteriormente resultaron ser hembras, aún cuando el sex ratio de la población está en torno a 1:1 (autores, no publicado). Así, por razones no determinadas, aunque tal vez originadas por competencia intersexual por el alimento, o relacionadas con limitaciones de tipo nutricional, los machos podrían llevar a cabo un mayor consumo de este tipo de presas pequeñas y tener por tanto, una mayor probabilidad de ingestión de perdigones de plomo. No obstante, hay que considerar que la bioacumulación del plomo en los tejidos animales es un proceso altamente dependiente del sexo, de manera que las vías de

incorporación y/o excreción de este contaminante pueden diferir de manera importante entre machos y hembras (Tejedor y González, 1992).

La frecuencia de individuos de la población insular con concentraciones de plomo en sangre indicativas de intoxicación aguda ($>200 \mu\text{g/L}$) fue mayor que la encontrada en las poblaciones peninsulares. Cuatro ejemplares canarios, todos ellos capturados durante la época cinegética, presentaron concentraciones en sangre por encima de $500 \mu\text{g/L}$, lo que se considera nivel indicativo de intoxicación subclínica. Uno de estos individuos capturado en el año 2000, presentó una concentración de $1,780 \mu\text{g/L}$, lo cual es considerado como intoxicación clínica. Este ejemplar no volvió a ser visto en ninguno de los controles de anillas realizados desde el año 2001, por lo que podría considerarse como un caso de intoxicación letal por plomo en Fuerteventura. Sin embargo, las poblaciones peninsulares tampoco están exentas de este tipo de intoxicación. Nuestros resultados indican que esta exposición debe ser en efecto elevada, especialmente en las poblaciones de Segovia y el Valle del Ebro, dado el gran porcentaje de individuos con niveles de plomo en sangre entre 100 y $200 \mu\text{g/L}$. Además, se detectó la presencia de un ejemplar con niveles de plomo en sangre $>200 \mu\text{g/L}$ en la población de Segovia. Las poblaciones continentales, pese a no coincidir espacio-temporalmente con la principal temporada de caza deportiva en la península, sí que permanecen expuestas, aunque en menor medida, a la ingestión de perdigones en la temporada de media veda. Además, pueden resultar de gran importancia otras vías de contaminación, como las actividades industriales, que en el continente son mucho más acusadas, o la ingestión de restos de pinturas u otros materiales contaminados en los vertederos, donde los alimoches peninsulares se alimentan con regularidad (autores, datos propios). Las poblaciones más afectadas son las que presentan una mayor dependencia de muladares y basureros, al contrario que la población gaditana, que consume preferentemente presas silvestres (Benítez et al., 2003).

La absorción y metabolización del plomo en los distintos tejidos de las aves es altamente variable, y depende de múltiples factores, tales como el sexo, la edad, la dieta, las alteraciones hormonales (que se producen durante el período reproductor, la muda o por interacción con otros compuestos disruptores, como, por ejemplo, pesticidas), y las posibilidades de la continuación de la exposición (Honda et al., 1987; Humphreys, 1990; Goyer, 1996; Rocke y Samuel, 1991; Franson, 1996;

Mateo, 1998). Esto puede resultar en diferencias en los efectos tóxicos del plomo, incluso ante una misma exposición. Es bien conocido que el plomo se acumula en el hueso a lo largo de la vida del individuo (Pain, 1996), evidenciando una exposición crónica. Este efecto, aunque no pudo ser constatado en las poblaciones continentales, fue muy evidente en el caso de la población insular, donde encontramos un marcado efecto de bioacumulación de plomo en este tejido con la edad. Numerosos trabajos han puesto de manifiesto que las hembras presentan mayores niveles de plomo en hueso que los machos, en relación con una mayor movilidad del calcio durante los procesos de osificación y/o formación de la cáscara de huevo (Honda et al., 1987; Tejedor y González, 1992). El hecho de que no encontráramos diferencias en la concentración de plomo en hueso entre sexos puede ser debido, entre otras cosas, a que las hembras suelen acumular el plomo en huesos de alto contenido medular, como fémur y esternón, que no fueron analizados en este estudio, más que en los de bajo contenido medular (huesos de las alas) (Finley y Dieter, 1978; Scheuhammer, 1987). A pesar de que la exposición reciente puede llegar a ser similar entre poblaciones durante el período reproductor, nuestros resultados referentes al contenido de plomo en hueso de los alimoches adultos revelan que en el caso de la población canaria, la exposición es continuada, o crónica, y claramente mayor que la que experimenta la población peninsular en el período no reproductor. Este hallazgo podría indicar que la exposición al plomo en la región africana de invernada es menor que la encontrada en el período reproductor. Este extremo sería razonable dado que en el Sahel no existe una actividad cinegética reseñable, aunque sí hay disponibilidad de armas de fuego para la población, que ocasionalmente las utiliza para abatir piezas muy determinadas (autores, obs. pers.).

La principal aportación de este estudio es la determinación toxicológica de los niveles de plomo en distintos tejidos de los alimoches, concretamente en el hueso y la sangre. Uno de nuestros resultados más relevantes obtenidos hasta el momento es la constatación del efecto negativo del plomo a largo plazo sobre las propiedades composicionales del hueso. Estudios recientes indican que los metales pesados y, en particular, el plomo, pueden afectar a la correcta mineralización del hueso, alterando directa o indirectamente la tasa de recambio, a través de la actividad de osteocitos y osteoclastos (Puzas et al., 1992; Kanti y Smith, 1997; Berglund et al., 2000; Rodríguez Navarro et al., 2002) y desempeñando un importante papel como agente

en la etiología de enfermedades óseas como la osteoporosis (Puzas, 2000). Mediante el uso de las técnicas de espectrometría de infrarrojos (FTIR), hemos podido determinar que el grado de mineralización ósea fue menor en aquellos individuos que presentaron mayores niveles de plomo en este tejido. Esta disminución del grado de mineralización puede suponer un incremento de la fragilidad de los huesos (Fleming et al., 2000; Whitehead y Fleming, 2000). De hecho, en Fuerteventura se ha registrado una frecuencia de fracturas e incluso de amputaciones de patas inusualmente elevada (10 individuos cojos hasta 2005, 7%). Aunque estas fracturas se han originado en la mayoría de los casos por enganche en los estabilizadores de las líneas eléctricas (Gangoso y Palacios, 2002), muy probablemente, las fracturas pueden estar potenciadas por una mayor fragilidad ósea. Además, estos accidentes suponen consecuencias fatales para dichos individuos, dado que éstos pueden considerarse “muertos” a efectos demográficos ya que no existen evidencias de que se incorporen con éxito a la población reproductora (autores, no publicado). Nuestros resultados también evidencian la existencia en la población canaria de efectos clínicos de la intoxicación por plomo a nivel hematológico. La concentración de este metal en sangre, indicativa de exposición reciente, estuvo claramente asociada a una respuesta eritropoyética compatible con anemia de tipo regenerativo (Campbell, 1994). Así, encontramos una elevada prevalencia de tipos de eritrocitos asociados a este tipo de respuesta (Goyer, 1996; Mateo, 1998), como los inmaduros (liberados ante un estado carencial o hemolítico antes de completar su proceso de maduración), policromáticos (eritrocitos inmaduros con punteado basófilo), fusiformes e hipocrómicos (observados ante una eritropoyesis acelerada y formación deficiente del grupo hemo). Finalmente, los efectos negativos del plomo también se evidenciaron a nivel de las anomalías nucleares, principalmente cariólisis compatible con la inhibición enzimática y daños celulares inducidos por el plomo (Campbell, 1994; Mateo, 1998).

Los efectos nocivos debidos a la contaminación por plomo dependen en gran medida de las especies (Beyer et al., 1988), siendo la tolerancia a este contaminante altamente variable (García Fernández et al., 2005). A pesar de la escasez de datos referentes a los niveles y efectos de la intoxicación por plomo en buitres (Reiser y Temple, 1981; Carpenter et al., 2003; García Fernández et al., 2005), nuestros resultados sugieren que los niveles encontrados en la población

canaria de alimoche podrían tener importantes consecuencias sobre el estado de salud de los individuos, y, consecuentemente, sobre las probabilidades de persistencia de esta amenazada población (Donázar, 2004). Además, la gran cantidad de presas cinegéticas malheridas o no cobradas presentes en Fuerteventura también está disponible para otras especies endémicas predatoras o carroñeras como ratoneros (*Buteo buteo insularum*), halcones de berbería (*Falco pelegrinoides*) y cuervos (*Corvus corax canariensis*), las cuales son también sedentarias y todas ellas presentan alguna categoría de amenaza según el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias (Decreto 151/2001 de 23 de julio). La intoxicación por plomo, puede también suponer un riesgo elevado para estas poblaciones, y no cabe descartar que haya desempeñado un importante papel en el declive de estas y otras especies de rapaces en el conjunto del archipiélago (García Fernández et al., 2005).

La intoxicación por plomo puede ser fácilmente subestimada, ya que sus efectos subletales son difícilmente detectables. Como ya ha sido mencionado, estos efectos negativos son muy diversos, y pueden manifestarse a muy largo plazo y en combinación con otros muchos factores (Franson et al., 1983; Buerger et al., 1986; Mateo et al., 1997b; Rocke y Samuel, 1991). Por el momento, desconocemos en qué medida estas elevadas concentraciones de plomo encontradas en la población canaria de alimoche pueden estar afectando directa o indirectamente, mediante la interacción con otros factores, a la capacidad de respuesta inmune, éxito reproductor, comportamiento y, en definitiva, a la supervivencia de los individuos. El monitoreo habitual basado en análisis de sangre tomados de manera puntual en el campo, resulta importante para constatar una exposición reciente al plomo, pero no aporta información acerca de la duración de la exposición, y menos aún de sus efectos (Fry, 2003). Sin duda, los efectos “silenciosos” puestos de manifiesto en este estudio, remarcan la necesidad de realizar monitoreos exhaustivos y amplios, dirigidos a la determinación de las características de la exposición y, especialmente, a la detección y aislamiento de algunos de los diversos efectos negativos de este contaminante sobre los individuos, para poder determinar el papel que este contaminante puede estar desempeñando como factor limitante en relación al declive y recuperación de poblaciones amenazadas (Pattee et al., 1990; Fry, 2003).

