

**EVALUACIÓN NO INVASIVA MEDIANTE PLUMAS DE LA  
EXPOSICIÓN AL PLOMO Y SU RELACIÓN CON HORMONAS  
DE ESTRÉS EN QUEBRANTAHUESOS DE LOS ALPES**

Universitat Autònoma de Barcelona

Máster universitario en zoonosis y una sola salud

Curso 2016/2017

Lidia Giménez Lozano

Directores: Rafael Mateo (IREC)

Manel López

# **EVALUACIÓN NO INVASIVA MEDIANTE PLUMAS DE LA EXPOSICIÓN AL PLOMO Y SU RELACIÓN CON HORMONAS DE ESTRÉS EN QUEBRANTAHUESOS DE LOS ALPES**

Universitat Autònoma de Barcelona

Máster universitario en zoonosis y una sola salud

Curso 2016/2017

Lidia Giménez Lozano

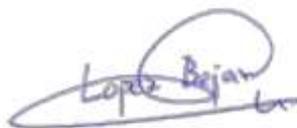
Directores: Rafael Mateo (IREC)

Manel López

Firma Estudiante



Firma Directores



## **Índice**

Resumen .....	Pág.1
Introducción .....	Pág.2
Objetivo .....	Pág.5
Materiales y métodos .....	Pág.6
Resultados y discusión .....	Pág.12
Conclusiones .....	Pág.20
Bibliografía .....	Pág.21
Anexo .....	Pág.24

## Resumen

Desde 1987 se lleva a cabo un proyecto en los Alpes para la reintroducción del quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*). Existen diferentes factores que pueden afectar al éxito de esta reintroducción, y uno de ellos es la exposición al plomo procedente de la munición usada en caza. Una exposición al plomo, aunque sea a nivel subletal, puede constituir una situación estresante que implica un aumento en los niveles de corticosterona circulantes. En aves escasas y de difícil captura conocer los niveles circulantes en sangre, tanto de plomo como de corticosterona, puede ser una tarea difícil y peligrosa para ellas. Por este motivo, el desarrollo de metodologías no invasivas para estudiar la exposición a contaminantes y sus respectivos biomarcadores se está orientando hacia el análisis de muestras fáciles de recoger, como son las plumas mudadas por las aves.

Los objetivos de este estudio son, cuantificar el grado de exposición al plomo que tienen los quebrantahuesos en los Alpes mediante el análisis de plumas mudadas encontradas en el campo, relacionarlos con los niveles de corticosterona en la misma pluma y definir los factores que afectan a las fluctuaciones de estos dos componentes a partir de 20 plumas pertenecientes a quebrantahuesos de este proyecto.

El análisis de los segmentos de las plumas reveló que la exposición anormal al plomo (probablemente por la ingestión de munición) presenta una prevalencia del 15% (tres plumas con niveles por encima de 2 µg/g de Pb en raquis), y que la incidencia anual de dicha exposición es del 30% (una pluma con una exposición anormal durante su desarrollo de aproximadamente dos meses de duración). La concentración de plomo en los segmentos del raquis de las plumas ha estado relacionada negativamente con la concentración de corticosterona, y también ha estado significativamente influenciada por la zona que habitan y el individuo (pluma) del que se trata.

La exposición anormal al plomo en las aves rapaces y carroñeras se asocia a la ingestión de munición de plomo. En el presente estudio observamos que la exposición a niveles elevados de plomo se puede dar en un porcentaje elevado de individuos de una población a lo largo del año, lo que en el caso de los quebrantahuesos de los Alpes puede conllevar un riesgo para la sostenibilidad de la población si esta exposición llega a ser letal.

## 1. Introducción

El quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) es la especie de buitre más amenazada de Europa. Su área de distribución histórica comprendía los sistemas montañosos del sur del Paleártico (Glutz von Blotzheim et al. 1971; Hiraldo et al. 1979), pero desapareció de la mayor parte de Europa durante el siglo XX, subsistiendo solamente en la Península Ibérica, Creta y Córcega, por lo que en Europa su estado de conservación actual es el de especie amenazada (Anexo I de la Directiva Aves EU 79/409/EEC, Apéndice II del convenio de Berna y del convenio de Bonn). Desde entonces ha habido numerosos proyectos de reintroducción en sus territorios históricos, como por ejemplo los Alpes y la Sierra de Cazorla (España). En los Alpes se está llevando a cabo un proyecto de reintroducción de quebrantahuesos desde 1978, gracias al cual actualmente se puede encontrar una población asentada con un total de 17 territorios (Frey et al. 1989). No obstante, el quebrantahuesos sigue estando sometido a amenazas para su conservación como es la exposición a sustancias tóxicas, tanto a consecuencia del uso ilegal de veneno para el control de depredadores como por la ingestión accidental de munición de plomo presente en las carroñas de las que se alimenta (Mateo et al. 2015; Margalida et al. 2008). A esto se suman una serie de factores estresantes ambientales, como la dificultad para encontrar alimento (p.e. reducción en la disponibilidad de carroñas de ganado) o las molestias causadas por presencia humana en las zonas de nidificación (Margalida et al. 2003).

La intoxicación aguda por plomo provocada por ingestión de objetos, básicamente perdigones y fragmentos de balas, es una de las más frecuentes en aves silvestres (Labonde, 1995), siendo las acuáticas y las rapaces los grupos más afectados (Negro et al. 1999). Estas intoxicaciones afectan a un gran número de funciones biológicas, cómo el éxito reproductivo, el crecimiento del animal o el comportamiento (Kendall et al. 1996). A la mortalidad directa causada por la intoxicación por plomo se suma la mayor vulnerabilidad de las aves intoxicadas a ser capturadas por otros predadores naturales debido a la afección neurológica causada por el plomo (Degernes et al. 1990). Los perdigones y fragmentos de balas se disuelven en la molleja debido a las condiciones ácidas y al propio efecto mecánico del estómago muscular. Las sales formadas son absorbidas a nivel del tracto gastrointestinal, pasando al torrente sanguíneo y acumulándose después en el hígado y otros órganos, donde a concentraciones altas pueden llevar al animal a la muerte (Ministerio de medio ambiente, 2006). Predominan

los daños neurológicos, digestivos y renales, y los efectos sobre el sistema circulatorio (Martorell, 2009).

Entre los estresantes ambientales se encuentran los agentes biológicos, las condiciones ambientales o los estímulos externos. Los animales reaccionan a estos condicionantes mediante diversos mecanismos, siendo uno de los más importantes la activación de un factor neurohormonal generado por el hipotálamo que lleva a la segregación de corticosterona, el principal glucocorticoide, involucrado en la regulación del metabolismo, las reacciones inmunológicas y las respuestas de estrés. Una situación estresante implica un cambio a nivel hormonal que lleva a las aves a mostrar conductas determinadas para afrontar dicha situación. La presencia de concentraciones elevadas de corticosterona a corto plazo facilita a estos animales la posibilidad de escapar de dichas situaciones (Wingfield et al. 1998). Un ejemplo puede ser el llamado estrés calórico, el cual conlleva la activación de conductas de disminución de la ingesta de alimentos, incrementos del consumo de agua y mecanismos de termorregulación - el repliegue de plumas, la extensión de alas y el jadeo - (Freeman, 1992). Sin embargo, concentraciones demasiado elevadas de dicha hormona pueden tener grandes efectos adversos sobre otras aptitudes del animal (Blas et al. 2007; Boonstra et al. 1998), afectando por ejemplo a la supervivencia y al éxito reproductivo. Se han observado incrementos de hasta el 250% de los niveles de corticosteroides en pájaros cuando se encuentran en situaciones de estrés (Nagra et al. 1963).

Existen diferentes metodologías que emplean diversos tejidos de los animales para cuantificar la exposición a contaminantes ambientales o diversos aspectos fisiológicos del individuo, como los niveles de hormonas de estrés. En aves, el uso de plumas para estos análisis está cada vez más extendido debido a que son registros a lo largo de un periodo de tiempo de las fluctuaciones de estos parámetros. Además, es un método de estudio no invasivo que permite recoger tamaños muestrales grandes y que no requiere de la captura de los animales, por lo que no se compromete la salud de las aves estudiadas (Roscales et al. 2006). La pluma crece a partir de una base altamente vascularizada que produce su estructura queratinizada. Durante el crecimiento de la pluma pueden incorporarse en su estructura proteica las hormonas y contaminantes ambientales que el ave tiene circulantes en sangre, de forma que los diferentes segmentos a lo largo de la longitud de la pluma reflejan la presencia de estas sustancias en sangre durante la cronología del crecimiento de la pluma (ptilocronología) (Bortolotti et al. 2008). Además, en las plumas se puede apreciar a simple vista la presencia de

bandas correspondientes a ciclos de crecimiento diarios (Grubb, 1989), que posteriormente pueden utilizarse para proporcionar una cronología detallada de la exposición a los contaminantes y hormonas. Al cortar la pluma en bandas de crecimiento específicas y medir las fluctuaciones a lo largo de la pluma, se puede crear un historial de exposición (Bortolotti et al. 2009).

El presente estudio integra el análisis de plomo y de hormonas de estrés en plumas de quebrantahuesos. De esta forma se puede valorar en la escala de tiempo correspondiente al crecimiento de la pluma el riesgo que tiene estas aves de sufrir casos de plumbismo, el nivel de estrés e incluso explorar el efecto que puede tener el plomo en los niveles circulantes de corticoides o viceversa, algo poco estudiado hasta el momento en las aves.



**Figura 1.** Coloración anaranjada característica del quebrantahuesos  
(Fuente: <http://deanimalia.com/montanaquebrantahuesos.html>)

## **2. Objetivos**

Los objetivos de este estudio son, mediante el análisis de plumas de quebrantahuesos, (a) cuantificar cual es el grado de exposición al plomo que tiene la población de esta especie residentes en los Alpes, (b) relacionar estos niveles con los de una hormona indicadora de estrés como es la corticosterona para ver qué interacción se mantiene entre las intoxicaciones por el metal pesado y el estrés que sufren estos animales, y por último (c) definir qué factores afectan a las posibles fluctuaciones de estos dos componentes.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1. Especie de estudio**

El quebrantahuesos es una especie de buitre que se caracteriza por su coloración y forma de alimentarse. Tiene la cabeza recubierta de plumas, y su coloración en los ejemplares adultos, así como la de tarsos y región ventral, es de espectro anaranjado - de mayor o menor intensidad - debido al uso de suelos cosméticos (aguas ferruginosas) y a la presencia de elementos cromóforos en este tipo de aguas que condicionan dichas tonalidades observadas (16; Fig. 1). El quebrantahuesos es un ave sedentaria y carroñera, su dieta se compone prácticamente en su totalidad de huesos de cadáveres de vertebrados, fundamentalmente mamíferos, principalmente ungulados de tamaño medio, aunque la especie puede presentar un espectro trófico muy variado adaptado a la disponibilidad de recursos presentes en cada territorio. (Margalida et al. 2008). Se encuentran ligados a zonas montañosas, debido a las técnicas de vuelo, el hábitat en el que obtiene el alimento y los sitios de nidificación –cuevas en el 74% de los casos- (Margalida et al. 2008).

#### **3.2. Toma de muestras**

Para este estudio fueron analizadas un total de 20 plumas de vuelo de quebrantahuesos que habitan en la región de los Alpes en los departamentos de Savoie, Haute-Savoie, Mercantour y los Alpes Marítimos. La recogida de las plumas se llevó a cabo mediante un método no invasivo, peinando los territorios donde habitan estos animales (conocidos gracias a estudios previos) en busca de plumas caídas durante la muda de las aves. Cada pluma procedía de un individuo diferente, del que se pudo conocer su sexo mediante el sexado molecular. En algunos casos fue posible conocer su edad y si era nacido en el programa de cría en cautividad o en libertad. Para la determinación de la edad, se diferenciaron a los animales anualmente hasta los nacidos 4 años antes de la toma de la muestra y los de más de 5 años fueron considerados adultos. En la tabla 1 se puede ver la información relativa a estas muestras.

#### **3.3. Preparación de las muestras**

Las plumas fueron sometidas a un proceso de limpieza inicial para eliminar toda contaminación exógena por metales pesados. Para ello se hizo un lavado sumergiendo las plumas enteras en agua del grifo y a continuación otro con agua Milli-Q. Seguidamente fueron secadas en una estufa a 40 °C durante toda una noche. No se llevó a cabo un lavado con ácidos diluidos (como es habitual en este tipo de estudios) para no

afectar a los niveles de corticosterona. Dado que sin un lavado más exhaustivo con ácido las barbas pueden retener una contaminación exógena importante, el análisis de plomo se llevó a cabo principalmente en el raquis, ya que se ha visto que no está tan afectado por la contaminación externa como las barbas (Cardiel et al. 2011).



**Figura 2.** Muestra (A) fragmento sin barbas, sólo usado para análisis de plomo (B) fragmento que contiene raquis y barbas, usado para analizar plomo y corticosterona

Una vez las plumas habían sido debidamente limpias, estas fueron divididas en fragmentos de unos 5 cm de longitud cada uno, tomando en cuenta las barras de crecimiento a fin de no partir ninguna de ellas en dos fragmentos diferentes, resultando así un total de 169 sub-muestras provenientes de las 20 plumas. De estos fragmentos se separó la parte de las barbas, que fue utilizada para analizar la corticosterona, del raquis, que fue utilizado para el análisis de plomo. Hay que tener en cuenta que no todas las sub-muestras contaban con una parte de barbas, ya que las sub-muestras relativas al inicio de la pluma no tienen aún barba presente (Fig. 2). Por lo tanto, el número de sub-muestras de barbas utilizadas para el análisis de corticosterona es menor ( $n=127$ ).

**Tabla 1.** Información de las muestras de plumas analizadas

<b>Muestra</b>	<b>Región</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso total (g)</b>	<b>Nº bandas total</b>	<b>Longitud total (cm)</b>	<b>Nº sub-muestras</b>
<b>VAL1</b>	73	-	Macho	5,5839	45	61,1	10
<b>FR0239</b>	4	4	Hembra	6,5268	29	62,9	10
<b>FR0185</b>	73	6	Macho	7,3527	41	68,6	11
<b>VAN9</b>	73	6	Hembra	2,0902	27	37,1	5
<b>FR0209</b>	74	6	Hembra	5,9349	34	58	9
<b>P608</b>	74	-	-	5,9467	43	56,5	9
<b>VAN7</b>	73	-	Macho	6,1712	46	58,6	9
<b>FR0182</b>	4	6	Macho	4,1015	40	46	7
<b>PB06</b>	73	-	-	6,2213	34	60,4	10
<b>FR0244</b>	74	6	Hembra	4,327	27	51,2	8
<b>PB03</b>	74	-	-	5,2514	37	52,8	8
<b>PB07</b>	73	6	Hembra	9,07	47	72,9	11
<b>FR0058</b>	4	6	Hembra	5,174	32	56,5	9
<b>PB02</b>	4	-	-	3,1622	19	46,4	7
<b>FR0243</b>	73	6	Hembra	6,4354	32	59,8	9
<b>FR0027</b>	4	-	Hembra	5,1785	46	56,4	8
<b>PB04</b>	6	-	-	7,7857	34	71,7	11
<b>PB01</b>	4	-	-	0,9598	22	21,3	2
<b>VAN 14</b>	73	-	Hembra	3,0477	25	43,5	7
<b>PB05</b>	4	-	-	6,0996	33	58,5	9

### 3.4. Análisis de plomo

La preparación de los raquis para poder analizar los niveles de plomo ha constado de una digestión de estos en medio ácido. Para ello, fueron añadidos a cada muestra 2,5 ml de ácido nítrico concentrado al 69% (Norma Pur, Prolabo) en tubos de cuarzo que fueron mantenidos en un termobloque a 50 °C durante 300 minutos, aumentando posteriormente la temperatura a 100 °C durante 300 minutos más. Seguidamente fueron añadidos 2 ml de peróxido de hidrógeno (Supra Pur, Merck) y la digestión en el termobloque continuó a 90 °C durante 45 minutos y finalmente a 120 °C durante otros 120 minutos. Una vez finalizado este proceso las muestras fueron enfriadas y enrasadas con agua milli-Q a un volumen de 15 ml en tubos de polipropileno.

Los niveles de plomo en la solución de la muestra digerida fueron determinados mediante un sistema de espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito

(GF-AAS) (AAAnalyst 800, Perkin Elmer), equipado con un corrector de fondo Zeeman y un automuestreador (AS800, Perkin Elmer), aplicando para la determinación analítica el método de adición de patrón. En cada atomización fueron añadidos 5  $\mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  y 3  $\mu\text{g}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  como modificadores de la matriz. La curva de calibración fue preparada a partir de una solución comercial con 1g/L de plomo (Panreac). La medida de la señal de la muestra se ha realizado en base al área de pico del espectro y con dos réplicas en el caso de las muestras y 3 para los patrones. El límite de detección de la técnica fue calculado como la desviación estándar de los blancos multiplicada por tres. A las muestras con niveles por debajo de esas concentraciones se les asignó un valor de concentración correspondiente a la mitad del límite de detección. Para evaluar y controlar la calidad de los resultados, se ha empleado material de referencia certificado. Para ello se han analizado muestras de ceniza de hueso (SRM 1400, National Institute of Standards and Technology).

En el caso del Pb, la masa característica es 30 pg/0,0044 A-s y se utiliza un patrón de Pb de 50  $\mu\text{g/L}$  para el cual se consideran correctas las variaciones de  $\pm 20\%$  en su masa característica.

Los límites de detección en los análisis de plomo (LOD) han sido de 1,451  $\mu\text{g/g}$  para las concentraciones de este metal pesado. El análisis de material certificado (de un total de 6 muestras) ha mostrado un *recovery* (media) del  $63,51 \pm 15,34\%$ .

### **3.5. Análisis de corticosterona**

Para el análisis de corticosterona se ha utilizado la parte de la pluma relativa a las barbas. Para ello se han triturado las muestras con una Mixer Mill MM200 a una frecuencia de 25 Hz durante un período de 10 minutos (salvo alguna excepción en que se ha tenido que ampliar a 15 minutos ya que la muestra no quedaba bien triturada). A las muestras trituradas se les ha añadido 3 ml de metanol y se han pasado por el vórtice durante 30 minutos. A continuación, se ha hecho la extracción de la hormona sometiendo las muestras a una agitación a una velocidad de 100 Hz y a 37°C durante un período de 18 horas. Posteriormente, las muestras se han centrifugado a 6000 rpm y 23°C durante 15 minutos. Se ha tomado 1,5 ml de sobrenadante de las muestras, que se han depositado en una estufa Heraeus Function Line T6 a 38 °C hasta su completa evaporación. Una vez completamente seca la muestra y a temperatura ambiente, se ha añadido 300 $\mu\text{l}$  de solución EIA Buffer proporcionada por el propio kit ELISA que se usará para el análisis. Se ha usado el mismo lote para todas las muestras con tal de

minimizar las diferencias entre *recovery* de extracción entre los lotes (Margalida et al. 2003).

Los niveles de corticosterona se han analizado mediante un Kit ELISA (Neogen® Corporation, Ayr, UK).

El kit ha sido previamente validado por el laboratorio (datos pendientes de publicación). Se han construido curvas de calibración para cada lectura basándose en las cantidades conocidas de corticosterona del kit comercial, realizando siete diluciones para curvas de calibración con valores ajustados al 98% o precisión superior.

El coeficiente de variación interensayo se ha evaluado corriendo las mismas muestras en diferentes kits de ELISA por duplicado. Las relaciones del conjunto de dilución creadas usando un solo conjunto y el tampón EIA han sido 1: 1, 1: 2, 1: 5 y 1:10. La curva de dilución y, en consecuencia, el ensayo de linealidad se ha calculado utilizando las relaciones de ajuste realizadas. La prueba de paralelismo comparando 2 curvas de calibración diferentes; una ha sido la curva creada a través de los estándares del kit ELISA. La otra, se ha realizado añadiendo cantidades conocidas de corticosterona (estándar modificado). La recuperación del pico se ha evaluado midiendo la recuperación final de corticosterona añadida a la muestra.

En cuanto a los análisis de corticosterona, los coeficientes de variación en el procedimiento han sido de 5,73 intraensayo y de 4.07 interensayo. Todas las muestras analizadas se han encontrado dentro de estos límites.

### **3.6. Análisis estadístico**

Todos los datos han sido procesados y analizados mediante el programa estadístico SPSS, y se ha considerado significativo un P-valor por debajo de 0,05.

Se ha llevado a cabo un test Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de las distribuciones de los datos de concentraciones de plomo y corticosterona. Al obtener una distribución no normal de los dos grupos de datos, las concentraciones se han transformado logarítmicamente (usando log10) y la normalidad se ha evaluado de nuevo. Todos los parámetros transformados en log10 se han distribuido normalmente y se han utilizado en el análisis estadístico.

Para ver si existe una relación entre las fluctuaciones en los niveles de plomo y los de corticosterona se ha llevado a cabo un test de Pearson para ver la correlación entre estas variables. Posteriormente se ha utilizado un Modelo Lineal Generalizado (GLM; F-test, Suma de cuadrados tipo III) para evaluar las diferencias en los niveles de plomo determinados ya que permite considerar varios factores y sus posibles interacciones en

un conjunto de datos desbalanceado. La concentración de plomo representa la variable dependiente y en el modelo se incluye la concentración de corticosterona y la velocidad de crecimiento de la pluma como covariables, y la región de la que proviene la muestra, el sexo y edad del sujeto, la porción de pluma a la que pertenece cada submuestra (anterior, media o posterior, el tipo de pluma analizada (primaria o secundaria), y la propia pluma individual como factores fijos.

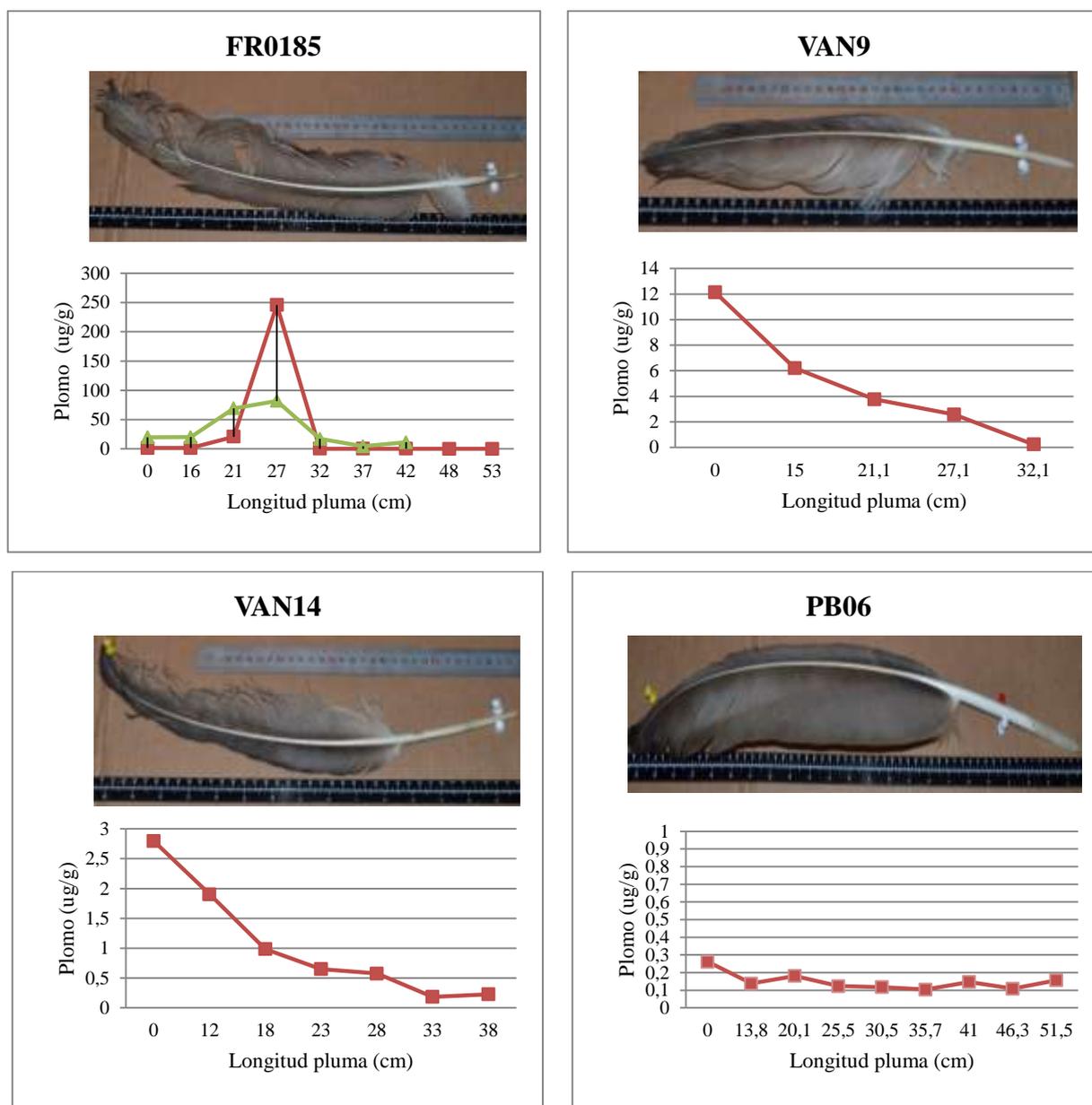
La concentración de la hormona se ha cuantificado tanto en pg/mg como en pg/mm. Se ha llevado a cabo un test de Pearson para ver si las variables están relacionadas y se ha obtenido una correlación positiva, con un p-valor del 0,001. Se toma como unidad para el análisis estadístico el cuantificado en pg/mg debido a que se considera más exacto y preciso, y debido a que las variables tienen una relación significativa entre ellas.

La prevalencia se calcula a partir de los casos observados durante el estudio en relación al número de muestra total. En lo que a la incidencia se refiere, se ha utilizado la media de longitudes de la plumas analizadas (media= 55,01) y la velocidad de crecimiento de la pluma (velocidad=1cm/día). A partir de estos 2 valores se ha extrapolado el tiempo medio que tarda una pluma en crecer, que junto al número de nuevos casos observados durante el estudio se obtiene el porcentaje mensual y anual de nuevos casos.

Para decidir qué medidas de concentración de plomo considerar cómo anormales se ha hecho la media de la concentración de los blancos analizados y se le ha sumado 2 veces la desviación estándar.

## 4. Resultados y Discusión

De las 20 plumas analizadas, se han observado picos de concentraciones de plomo en 3 muestras: FR0185, VAN9 y VAN14. En la figura 3 se pueden observar estas variaciones, junto a un gráfico que muestra una pluma en la que no hay ningún pico de concentración como ejemplo. En el anexo 1 (Fig. S1) se incluyen los gráficos pertenecientes a las demás plumas, donde se pueden observar las fluctuaciones pertinentes.



**Figura 3.** Gráficos ilustrativos de las fluctuaciones de plomo destacadas. En FR0185, la línea verde corresponde a los niveles de plomo en barbas.

El muestreo de plomo mediante plumas es un poco complicado y tiene que interpretarse adecuadamente, ya que el grado de contaminación externa de este metal puede ser considerable. Por este motivo, se ha analizado el plomo en los raquis -y no en las barbas- que tienen un grado de contaminación externa menor (Cardiel et al. 2011).

Se han considerado niveles tóxicos de plomo los que han sobrepasado los 1µg/g. De todas las muestras, y teniendo en cuenta estos picos en las concentraciones, se han encontrado 3 plumas que llegan a tener niveles de plomo por encima de los considerados tóxicos (Tabla 2). Son FR0185, con una concentración máxima de 245,79 µg/g, VAN9, con un pico máximo de 12,14 µg/g y VAN14 con un pico máximo de 2,79 µg/g.

**Tabla 2.** Estadísticos descriptivos de los datos obtenidos mediante el análisis laboratorial de plomo y corticosterona de las muestras estudiadas.

	<b>ugPb/g</b>	<b>SE</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>PgCorticosterona/mg</b>	<b>SE</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
	<b>(media)</b>				<b>(media)</b>			
<b>VAL1</b>	0,163	0,058	0,038	0,663	21,517	2,087	15,893	32,785
<b>FR0239</b>	0,087	0,026	0,024	0,246	18,783	0,973	16,107	23,302
<b>FR0185</b>	24,532	22,203	0,022	245,795	17,270	0,960	14,091	21,649
<b>VAN9</b>	4,681	2,591	0,236	12,137	10,912	2,238	8,674	13,150
<b>FR0209</b>	0,171	0,026	0,091	0,339	10,881	0,905	8,321	15,587
<b>P608</b>	0,149	0,016	0,104	0,262	18,334	1,246	13,703	22,679
<b>VAN7</b>	0,496	0,075	0,217	0,880	9,972	0,911	7,681	14,221
<b>FR0182</b>	0,216	0,039	0,119	0,381	11,486	2,530	7,377	23,808
<b>PB06</b>	0,079	0,039	0,011	0,422	16,784	1,018	14,320	21,618
<b>FR0244</b>	0,095	0,044	0,018	0,396	20,102	3,554	11,942	36,585
<b>PB03</b>	0,131	0,022	0,044	0,253	13,966	1,397	10,074	19,389
<b>PB07</b>	0,157	0,021	0,074	0,276	16,378	1,421	11,780	24,874
<b>FR0058</b>	0,285	0,070	0,108	0,670	13,488	1,029	8,734	17,152
<b>PB02</b>	0,349	0,076	0,183	0,737	18,761	3,102	9,708	28,521
<b>FR0243</b>	0,177	0,021	0,088	0,293	16,858	2,133	7,968	25,551
<b>FR0027</b>	0,235	0,033	0,144	0,395	12,222	0,686	9,429	13,841
<b>PB04</b>	0,186	0,024	0,101	0,317	26,963	3,261	15,990	45,759
<b>PB01</b>	0,363	0,053	0,310	0,416	5,835	1,223	4,611	7,058
<b>VAN 14</b>	1,047	0,365	0,186	2,795	15,768	3,126	7,639	22,691
<b>PB05</b>	0,207	0,022	0,130	0,300	9,868	1,147	6,559	15,522

En el caso de FR0185 se ha analizado el plomo también en las barbas, con tal de asegurar que los niveles tan obtenidos en raquis no fueran debidos a una contaminación externa. Este análisis ha mostrado que en barbas sigue la misma tendencia, aunque los niveles están un poco por debajo, lo que indica que en esta pluma el plomo se fijó mucho, pues normalmente las barbas acumulan concentraciones más elevadas (debidas también al mayor grado de contaminación externa). Este dato indica que los niveles de plomo obtenidos en raquis no se han debido a un hecho externo.

Se han documentado 3 intoxicaciones por plomo de un total de 20 individuos, por lo que la prevalencia es del 15%. En estudios de campo similares, se observan valores parecidos e incluso más elevados. En un estudio con águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*) la prevalencia fue del 17,23% (Reichel et al. 1984), y en Francia estudios con aguilucho lagunero (*Circus aeruginosus*) muestran prevalencias de entre el 25 y el 35% (Pain et al. 1993).

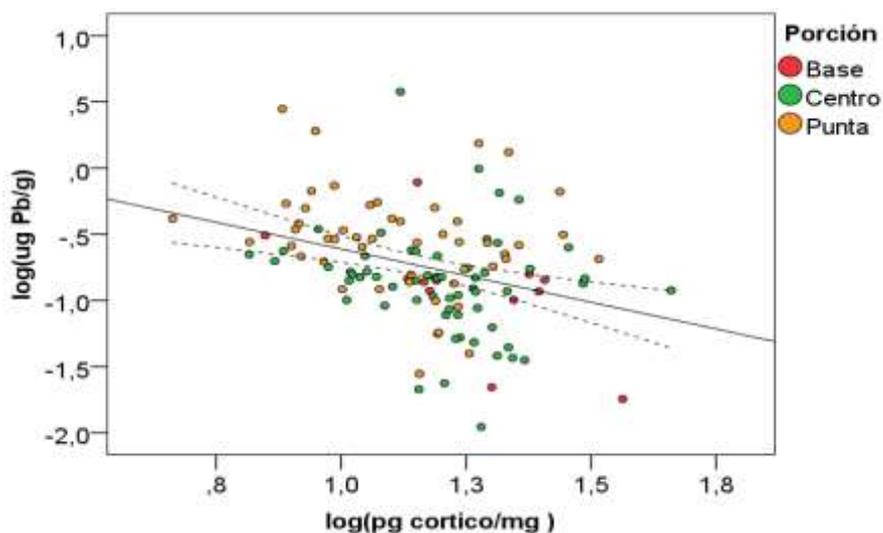
La comparación de prevalencias entre la especie sujeta al estudio y otras especies, con claras diferencias en sus hábitos alimenticios, es de interés. Se cree que las intoxicaciones halladas en el estudio se deben a la ingestión de fragmentos de munición de plomo incrustados en las canales de animales disparados, que es la principal fuente de exposición al plomo en rapaces (Roscales et al. 2009). Además, no hay industrias o minería activa en el rango de distribución de la población que puedan ser fuentes de plomo, por lo que la exposición no es probable que esté relacionada con la contaminación ambiental. Sin embargo, sería muy interesante poder trabajar con ratios isotópicos en estudios futuros para ampliar sustancialmente y concretar las fuentes de las intoxicaciones. Una prevalencia menor en el quebrantahuesos podría venir explicada por el hecho de que se alimenta de animales de mayor tamaño que otras rapaces, con una contaminación por perdigones de plomo potencialmente menor que animales más pequeños y que constituyen un porcentaje de la dieta mayor en otras especies de rapaces, como pueden ser el conejo y las aves acuáticas.

En el caso de las plumas VAN9 y VAN14, los niveles de plomo están en su máximo rango al inicio de su desarrollo, y van disminuyendo a lo largo del crecimiento de susodicha. Eso implica no poder considerar este caso cuándo se calcula la incidencia, pues no se considera un nuevo caso durante el transcurso del estudio. Las plumas han tardado una media de 55,01 días en crecer, y en ese período de tiempo se ha documentado 1 nuevo caso de intoxicaciones por este metal pesado de las 20 muestras analizadas. Teniendo en cuenta estos datos, se puede concluir que la incidencia es del

2,5%. Este dato es muy interesante y deberá tenerse en cuenta en estudios próximos ya que no hay mucha información sobre cuáles son los rangos de incidencia en casos de intoxicaciones por metales pesados, y no se dispone de información sobre la magnitud y duración de las intoxicaciones, Así, esto ha sido proporcionado gracias al hecho de que se haya realizado el análisis de plomo en plumas pues evalúa la exposición al plomo durante un período de varios meses.

Los efectos sobre la salud de la exposición al plomo en la vida silvestre se expresan más comúnmente en términos de mortalidad, pero hay que tener en cuenta el gran número de exposiciones subletales que se dan en la naturaleza. Cuando se produce una ingestión de plomo y este se digiere, puede afectar a múltiples sistemas de órganos en los que, cómo se ha descrito con anterioridad, predominan los daños neurológicos, digestivos y renales, y los efectos sobre el sistema circulatorio (Martorell, 2009), incluyendo el aumento de la susceptibilidad a otras enfermedades y accidentes. Estas exposiciones implicarían cambios en los niveles de corticosterona, pues lo animales se someten a situaciones estresantes. Se ha descrito una correlación negativa estadísticamente significativa entre la concentración de plomo en el raquis de cada fragmento de pluma y los niveles de corticosterona detectados en las barbas del mismo fragmento ( $n=126$ ,  $r=-0.258$ ,  $p=0.004$ ). Esta relación ha sido más significativa una vez excluidos los tres fragmentos de pluma con niveles anormalmente altos de plomo ( $n=123$ ,  $r=-0.328$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 4).

**Fig. 4.** Correlación entre la concentración de plomo y la de corticosterona divididos según el fragmento al que pertenecía la sub-muestra.



A continuación se ha valorado la posibilidad de que esta observación pueda deberse a diferencias entre porciones de la pluma (cálamo-base, centro o punta) o a la velocidad de crecimiento de la pluma en cada fragmento. Mediante un modelo lineal generalizado incluyendo la porción como un factor y la velocidad de crecimiento como una covariable, se ha podido comprobar que ninguna de estas variables afecta a la relación inversa entre corticosterona y plomo en las plumas, que se ha mantenido significativa e inversa ( $\chi^2$  de Wald=4.708,  $p=0.030$ ; Tabla 3). Estos resultados se pueden explicar a partir de la hipótesis inicial según la que el plomo genera estrés en los quebrantahuesos aunque no llegue a tener un efecto letal en ellos, reflejándose éste en los niveles de corticosterona. El plomo en sangre empieza a aumentar debido a una exposición a este, y esto genera estrés al sujeto. Posteriormente, los niveles de corticosterona suben para combatir este estrés haciendo que el animal pueda estar más activo y seguir alimentándose, lo que hace que el plomo empiece a eliminarse del organismo. Así, los niveles de plomo bajan gracias a que los de corticosterona se elevan en el organismo.

**Tabla 3.** Resumen de los modelos lineales generalizados usados para estudiar la relación entre las concentraciones de plomo en raquis y corticosterona en barbas de los mismos fragmentos de plumas de quebrantahuesos.

<b>Modelo 1. Log Corticosterona (ng/g) = Log Pb * Crecimiento * Porción</b>			
<b>Variable</b>	<b>B</b>	<b>SE</b>	<b>p</b>
Log Pb ( $\mu\text{g/g}$ )	-0.085	0.039	0.030
Crecimiento (mm/barra)	0.001	0.003	0.699
Porción Base	0.053	0.063	0.397
Centro	0.034	0.034	0.309
Punta	0		
<b>Modelo 2. Log Pb (<math>\mu\text{g/g}</math>) = Log Corticosterona * Crecimiento * Porción</b>			
<b>Variable</b>	<b>B</b>	<b>SE</b>	<b>p</b>
Log Corticosterona (ng/g)	-0.488	0.225	0.030
Velocidad de Crecimiento (mm/barra)	0.004	0.008	0.616
Porción Base	-0.133	0.151	0.377
Centro	-0.272	0.077	<0.001
Punta	0		

Sin embargo, al analizar los datos con el modelo GLM teniendo en cuenta todos los factores de los que se dispone (Edad, sexo, tipo de pluma, fragmento, pluma individual

y territorio), la relación entre niveles de plomo y corticosterona deja de ser significativa, el efecto desaparece. Al analizar los factores que afectan al plomo se obtiene una relación significativa entre la zona de la que proviene la muestra, la pluma de la que se trata y la porción de pluma analizada, mientras que la velocidad de crecimiento de la pluma no tiene un efecto significativo (Tabla 4). Los datos de los que se disponen de sexo y edad son incompletos y no se obtienen diferencias significativas, por los que finalmente se decide excluir del modelo.

**Tabla 4.** Resumen del modelo lineal generalizados usado para estudiar la relación entre la concentraciones de plomo y los factores que pueden influir en ella.

<b>Modelo GLM</b>		
	<b><math>\chi^2</math> de Wald</b>	<b>P</b>
Región	33,088	0,000
velocidad	0,727	0,394
Fragmento	27,030	0,000
Log corticosterona (ng/g)	0,126	0,723
Pluma(Región)	153,353	0,000

En cuanto a la influencia que tiene la región sobre los niveles de plomo, las diferencias significativas se encuentran en la zona de Savoie (Tabla 5), mientras que en las otras 3 zonas los quebrantahuesos tienen niveles estadísticamente similares. Savoie es un departamento francés situado al nordeste del país, que tiene antigua tradición minera, aunque no cuenta con ninguna activa, por lo que los niveles elevados no van a deberse a intoxicaciones ambientales. La media de las muestras pertenecientes a esta zona supera los lindares de niveles de plomo considerados como tóxicos (4,312  $\mu\text{g/g}$ ). Hay que tener en cuenta que las 3 plumas con niveles anormales de plomo se han hallado en esta zona, si bien las otras muestras del territorio tenían niveles basales de plomo. Se cree que estas intoxicaciones han sido debidas a ingestión de munición, pues no hay diferencias en cuanto a legislación, forma de caza, ni ningún otro parámetro que pueda explicar las diferencias entre zonas.

Por otra parte, las diferencias entre plumas son fácilmente explicables debido a que los valores medios de concentraciones de plomo en cada una son muy dispares. Podemos encontrar así en alguna de las plumas un valor medio de plomo extremadamente anormal (FR0185, con una concentración media de 24,53  $\mu\text{g/g}$  y un pico de 245,79

µg/g). Para comprobar que no se tratase de una muestra contaminada se han analizado las barbas también y se ha observado que el patrón que ha seguido la fluctuación de los niveles de plomo es la misma que en los raquis, por lo que estos niveles tienen que venir explicados por una intoxicación del animal y no por una contaminación externa. Este valor invita a pensar que los quebrantahuesos son animales con una gran tolerancia a estas intoxicaciones, pues se considera que niveles por encima de 1 µg/g en raquis producirán efectos tóxicos.

**Tabla 5.** Estadísticos descriptivos de los datos obtenidos mediante el análisis laboratorial de plomo y corticosterona de las muestras estudiadas.

Zona	N(N) <sup>a</sup>	Plomo (µg/g)				Corticosterona (ng/g)			
		Media	SE	Min	Max	Media	SE	Min	Max
Savoie	8 (71)	4,312	3,466	0,011	245,795	16,294	0,740	7,639	32,785
Haute-Savoie	4 (34)	0,138	0,014	0,018	0,396	15,727	1,165	8,321	36,585
Mercantour	7 (52)	0,228	0,021	0,024	0,737	13,567	0,847	4,611	28,521
Alpes Marítimos	1 (11)	0,186	0,024	0,101	0,317	26,963	3,261	15,990	45,759

N<sup>a</sup>= Numero de plumas N= Número de fragmentos

Las plumas han mostrado una disminución en los niveles de plomo a lo largo del crecimiento de la pluma. Las diferencias entre fragmento anterior (raquis), medio y posterior son significativas, hallando concentraciones de plomo más pequeñas en los raquis. La corticosterona por lo contrario, aumenta a lo largo del crecimiento, lo que podría explicar la disminución del plomo. La limitación de no tener barbas en los fragmentos anteriores, más cercanos a los raquis, para poder analizar los niveles de corticosterona, dificulta poder relacionar la disminución de plomo en el fragmento anterior con el posible aumento de la hormona, y puede ser la responsable de la relación no significativa entre niveles de plomo y corticosterona.

La munición de plomo representa un riesgo para la conservación de estos animales que hay que tener en cuenta, y las medidas obtenidas tienen que servir también como bioindicadoras; los quebrantahuesos se alimentan de carne de caza abatida, lo que implica que la carne contaminada también puede usarse para el consumo humano. Esto puede suponer un problema de salud pública, ya que la munición de plomo presente en

la carne de caza puede liberar cantidades de plomo significativas durante la cocción (Antor, 2003).

Las medidas para reducir la incidencia de plumbismo en esta especie pasa por utilizar municiones alternativas que no contengan plomo, sustituyendo la munición de plomo por otra de materiales no tóxicos como acero o cobre. Con medidas de este tipo se puede frenar la deposición de más perdigones de plomo en los cotos de caza en los que se alimentan los quebrantahuesos. Aun así, hay que considerar los perdigones acumulados en el medio, que quedarían depositados como contaminación residual.

## 5. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas a partir de este estudio son las siguientes:

- Se producen intoxicaciones por plomo en la población de quebrantahuesos que forman parte del proyecto de reintroducción en los Alpes.
- Estos animales tienen una tolerancia alta al plomo, y pueden sobrevivir con altas concentraciones en sangre.
- Esta población tiene una prevalencia del 15%, algo menor que otras especies de rapaces. Esto puede ser debido a sus hábitos alimenticios.
- El hecho de usar plumas para estudiar los niveles de plomo y corticosterona ayuda a tener datos a largo plazo, lo que facilita obtener medidas de incidencia, muy útiles y necesarias para poder aplicar medidas de conservación.
- El aumento de plomo en el organismo de estos animales implica cambios en los niveles de corticosterona que tienen en sangre.
- El territorio en el que residen los animales dentro de los Alpes influye en los niveles de plomo que tienen estos en sangre. También hay variaciones individuales (entre individuos) estadísticamente significativas.
- Las intoxicaciones observadas parecen estar causadas por ingestiones de munición de plomo, ya que no hay evidencias de que puedan deberse a contaminación ambiental por minas o industrias colindantes.
- Los niveles de plomo que tienen los quebrantahuesos pueden ser usados como bioindicadores del estado en el que se encuentran las presas que pueden ser consumidas también por seres humanos.
- Es necesario encontrar alternativas a la munición de plomo para ayudar a que esta población reintroducida y establecida en los Alpes tenga una probabilidad mayor de instalarse de forma definitiva. Una alternativa podría ser la sustitución de la munición por otra hecha de materiales inocuos para los animales, como el cobre o el acero.

## 6. Bibliografía

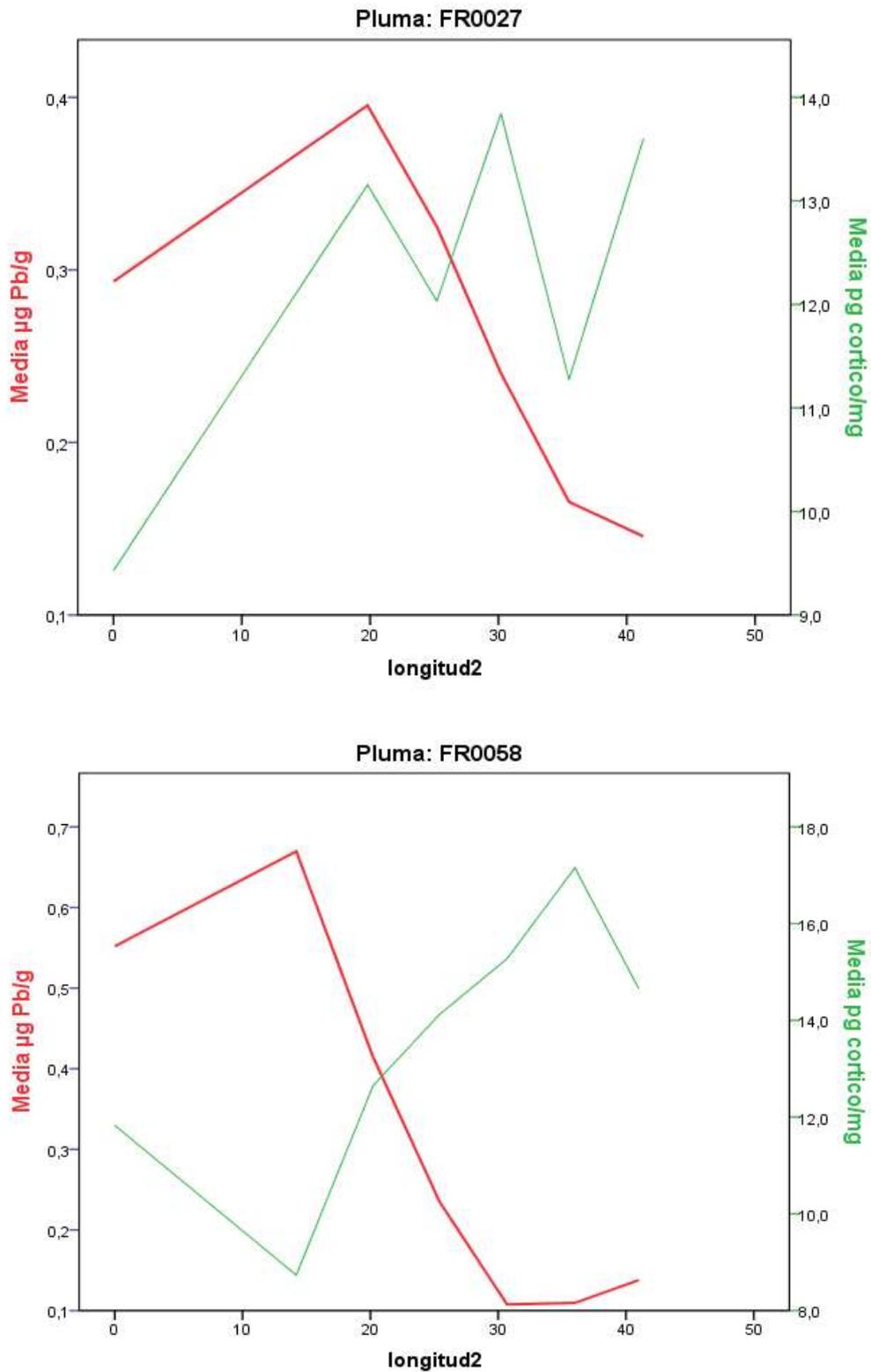
1. ANTOR, R.J. 2003. El impacto del veneno en la población no reproductora de quebrantahuesos: implicaciones para el futuro de la especie en los Pirineos. *Quercus*, 212: 14-20. 1
2. BLAS, J., BORTOLOTTI, G.R., TELLA, J.L., MARCHANT, T.A. 2007. Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:8880–8884.
3. BOONSTRA, R., HIK, D., SINGLETON, G.R., TINNIKOV, A. 1998. The impact of predator-induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecol. Monogr.* 79: 317–394.
4. BORTOLOTTI, G.R., MARCHANT, T.A., BLAS, J., GERMAN, T. 2008. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. *Functional Ecology* 22: 494–500
5. BORTOLOTTI, G.R., MARCHANT, T.A., BLAS, J., CABEZAS, S. 2009. Tracking stress: localisation, deposition and stability of corticosterone in feathers. *The Journal of Experimental Biology* 212: 1477-1482
6. BRUGER, J., GOCHFELD, M. (1994) *Seabirds on Islands: Threats, Case Studies, and Action Plans.* *Bird Life International*: 39–67
7. CARDIEL, I.E., TAGGART, M.A., MATEO, R. 2011. Use of the ratio Pb-Al to discriminate between internal and external deposition of Pb in feathers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 911–917.
8. DEGERNES, L.A., TALBOT, B.J., MUELLER, L.R. 1990. Raptor Foot Care. *Journal of the Association of Avian Veterinarians* 4, No. 2: 93-95.
9. FREEMAN, B.M. 1992. Energy metabolism physiology and biochemistry of the domestic fowl. *Poultry Sci* 4: 137-146
10. FREY, H., WALTER, W. 1989. The Reintroduction of the Bearded Vulture *Gypaetus barbatus* into the Alps. *Raptors in the Modern World.*
11. GLUTZ VON BLOTZHEIM, U., BAUER, K., BEZZEL, E. 1971. *Handbuch der Vögel Mitteleuropas.* Vol. 4: Falconiformes.
12. GRUBB, T.C. 1989. Ptilochronology: Feather Growth Bars as Indicators of Nutritional Status. *The Auk. Ornithological advances.* Vol. 106, No. 2: 314-320

13. HIRALDO, F., DELIBES, M., CALDERÓN, J. 1979. El quebrantahuesos *Gypaetus barbatus*. Sistemática, Taxonomía, Biología, Distribución y Protección. Instituto para la Conservación de la Naturaleza, Madrid. Monografías, 22.
14. KENDALL, R.J., LACHER, T., BUNCK, C., DANIEL, B., DRIVER, C., GRUE, C.E., LEIGHTON, F., STANSLEY, W., WATANABE, P.G., WHITWORTH, M. 1996. An ecological risk assessment of lead shot exposure in non-waterfowl avian species: upland game birds and raptors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, No. 1: 4–20.
15. LABONDE, J. 1995. Toxicity in pet avian patients. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 4, 23-31.
16. LOCKE, L.N., FRIEND, M. 1992. Lead poisoning of avian species other than waterfowl. *Lead poisoning in waterfowl*, ed. Pain, D.J.: 19-22.
17. MARGALIDA, A., GARCÍA, D., BERTRAN, J., HEREDIA, R. 2003. Breeding biology and success of the Bearded Vulture *Gypaetus barbatus* in the eastern Pyrenees. *IBIS* 145: 244-252.
18. MARGALIDA, A., DONÁZAR, J., BUSTAMANTE, J., HÉRNANDEZ, F.J., ROMERO-PUJANTE, M. 2008. Application of a predictive model to detect long-term changes in nest-site selection in the bearded vulture *Gypaetus barbatus*: conservation in relation to territory shrinkage. *Ibis*, 150 (2): 242-249.
19. MARGALIDA, A., HEREDIA, R., RAZIN, M., HERNÁNDEZ, M. 2008. Sources of variation in mortality of the Bearded Vulture *Gypaetus barbatus* in Europe. *Bird Conservation International*, 18: 1–10.
20. MARTORELL, J. 2009. Intoxicaciones en aves. *Clinica Veterinaria de Pequeños Animales* 29 (3): 172-178.
21. MATEO, R., RODRÍGUEZ DE LA CRUZ, M., VIDAL, D., REGLERO, M., CAMARERO, P. 2007. Transfer of lead from shot pellets to game meat during cooking. *Science of the Total Environment* 372:480-485
22. MATEO, R., SANCHEZ-BARBUDO, I.S., CAMARERO, P.R. MARTÍNEZ, J.M. 2015. Risk assessment of bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) exposure to topical antiparasitics used in livestock within an ecotoxicovigilance framework. *Science of The Total Environment* 536: 704-712
23. MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE. 2006. El plomo.

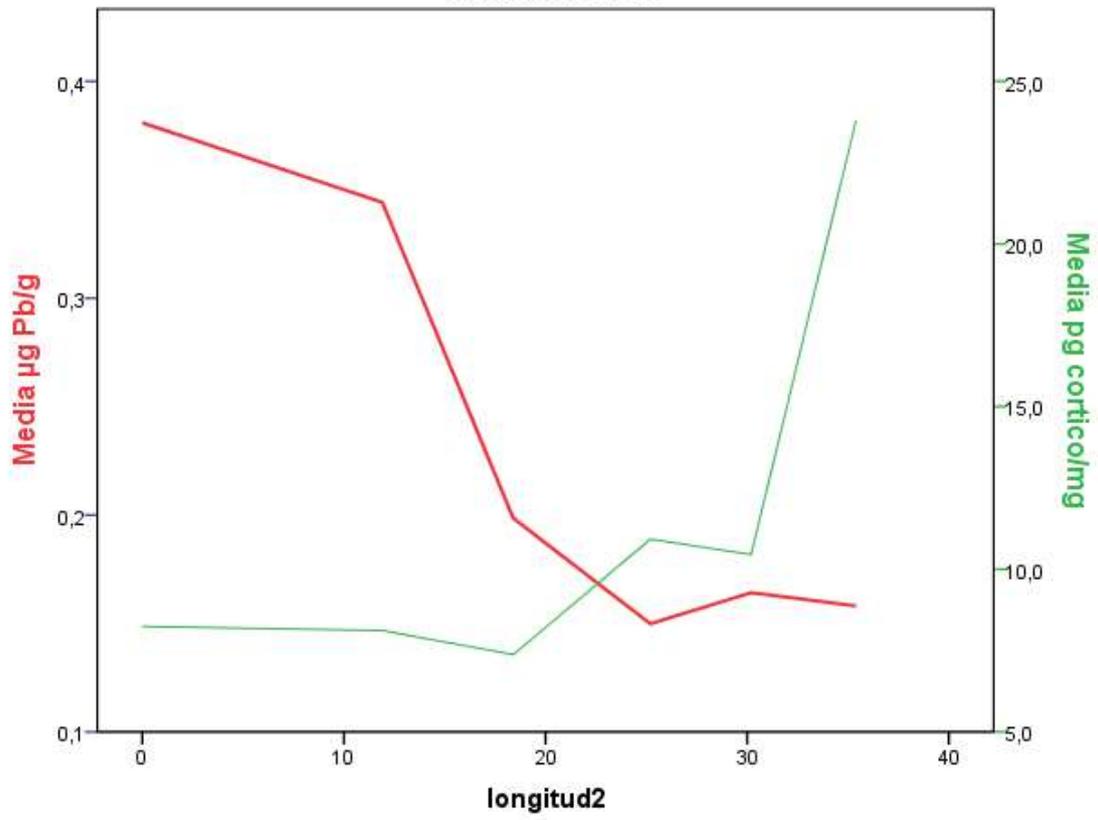
24. NAGRA, C.L., MEYER, R.K. 1963. Influence of corticosterone on the metabolism of palmitate and glucose in cockerels. *General and Comparative Endocrinology*. Volume 3: 131-138.
25. NEGRO, J.J., MARGALIDA, A., HIRALDO, F., HERDIA, R. 1999. The function of cosmetic colouration in bearded cultures: when art imitates life. *Animal Behaviour* 58: F14-F17.
26. PAIN, D.J., AMIARD-TRIQUET, C., BAVOUX, C., BURNELEAU, G., LEON, L., NICOLAU-GUILLAUMET, P. (1993) Lead poisoning in wild populations of Marsh Harriers *Circus aeruginosus* in the Camargue and Charente-Maritime, France. *Ibis*. Volume 135, Issue 4: 379–386
27. REICHEL, W.L., SHMELING, S.K., CROMATINE, E., KAISER, T.E., KRYNITSKY, A.J., LAMONT, T.G., MULHERNS, B.M., PROUNTY, R.M., STAFFORD, C.J., SWINEFORD, D.M. (1984) Pesticide, PCB, and lead residues and necropsy data for bald eagles from 32 states-1978–8. *Environmental Monitoring and Assessment*. Volume 4, Number 4: 395
28. ROSCALES, J.L., SÁEZ, M., BLÁZQUEZ, E., FERRER, M., GIL, J.A., MATEO, R., JIMÉNEZ, B. 2009. Evaluación no destructiva de la exposición a plomo en rapaces amenazadas en parques nacionales: el águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) y el quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*). *Proyectos de investigación en parques nacionales 2005-2008*: 215-228.
29. WALTERS, J.R., DERRICKSON, S.R., FRY, D.M., HAIG, S.M., MARZLUFF, J.M., WUNDERLE, J.M. 2010. Status of the California condor (*Gymnogyps Californianus*) and efforts to achieve its recovery. *The Auk* 127(4): 969-1001.
30. WINGFIELD, J.C., MANEY, D.L., BREUNER, C.W., JACOBS, J.D., LYNN, S., RAMENOFKY, M., RICHARDSON, R.D. 1998. Ecological bases of hormone-behavior interactions: the “Emergency life history stage”. *Am Zool* 38: 191–206.

## 7. Anexo

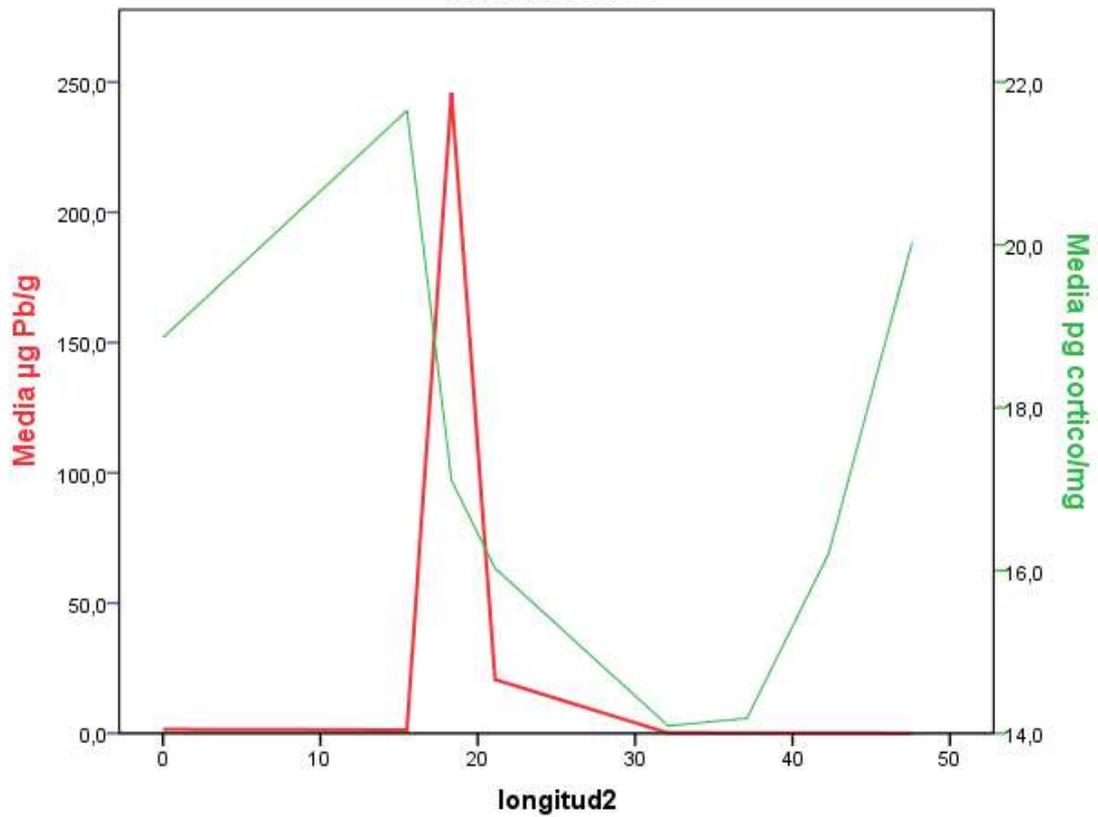
Figura S1. Relación de 20 gráficos pertenecientes a las 20 plumas analizadas donde se pueden observar las fluctuaciones de los niveles de plomo y de corticosterona de las plumas.



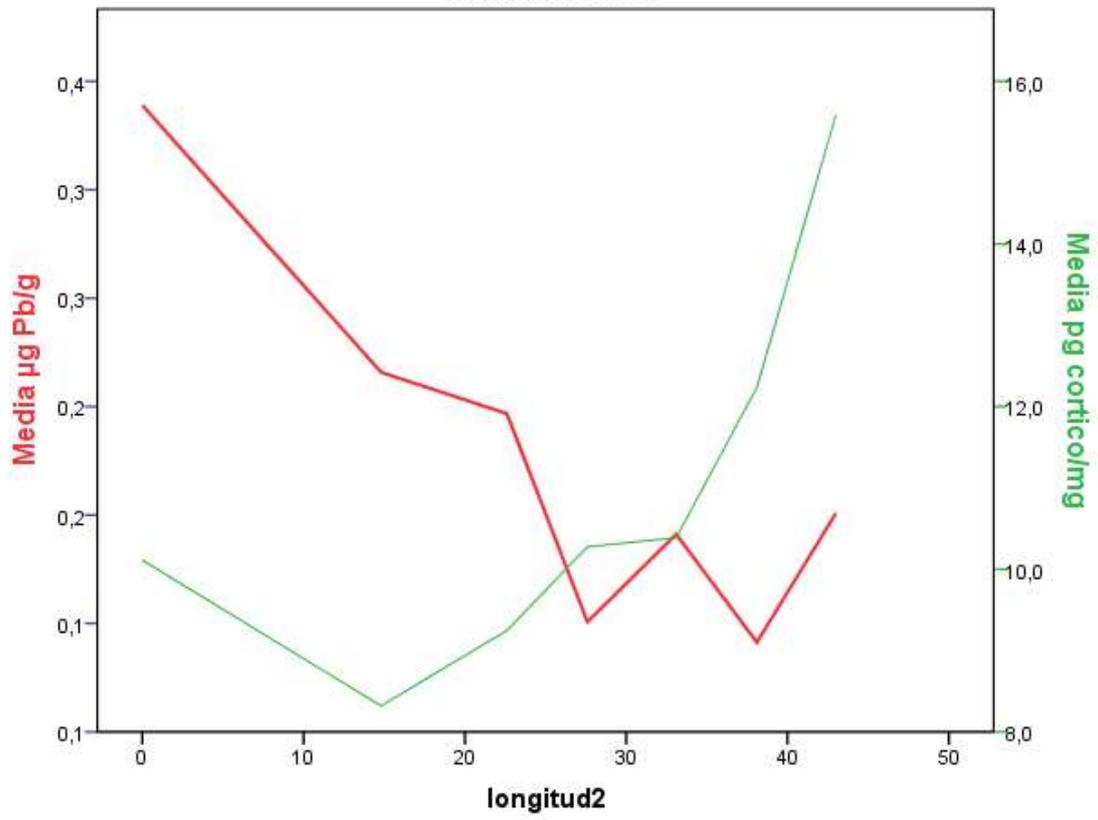
Pluma: FR0182



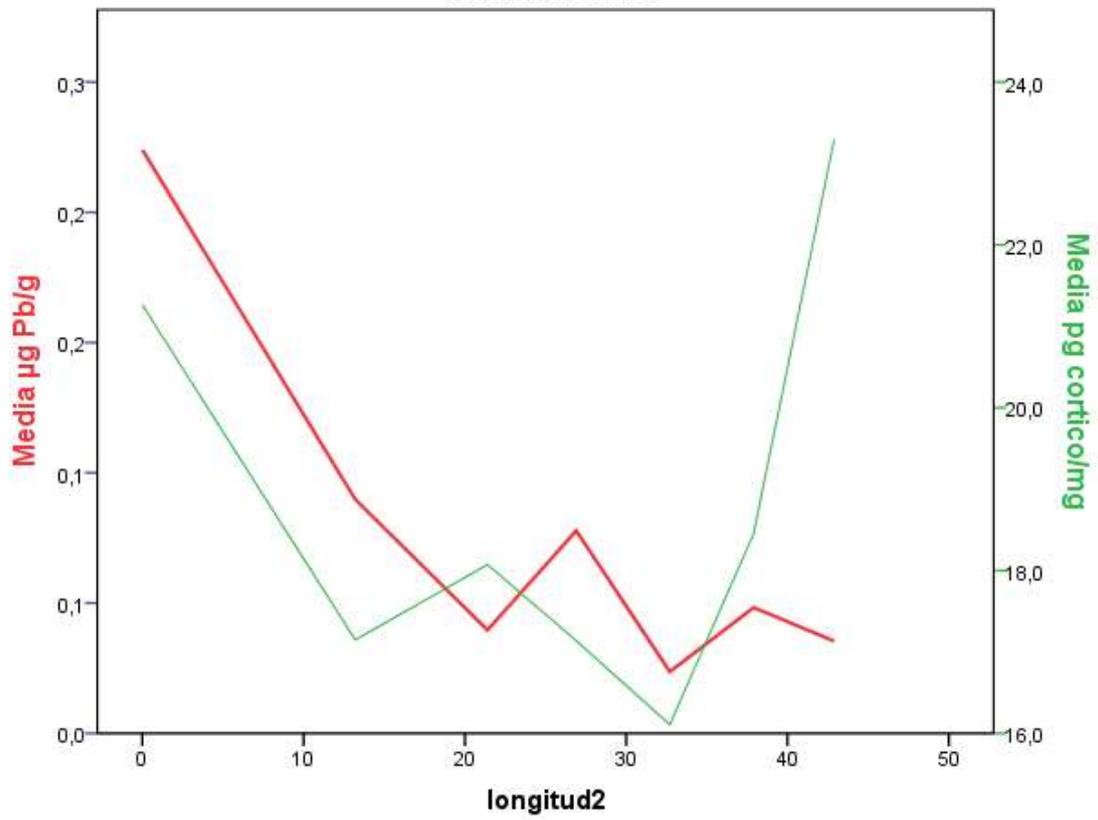
Pluma: FR0185



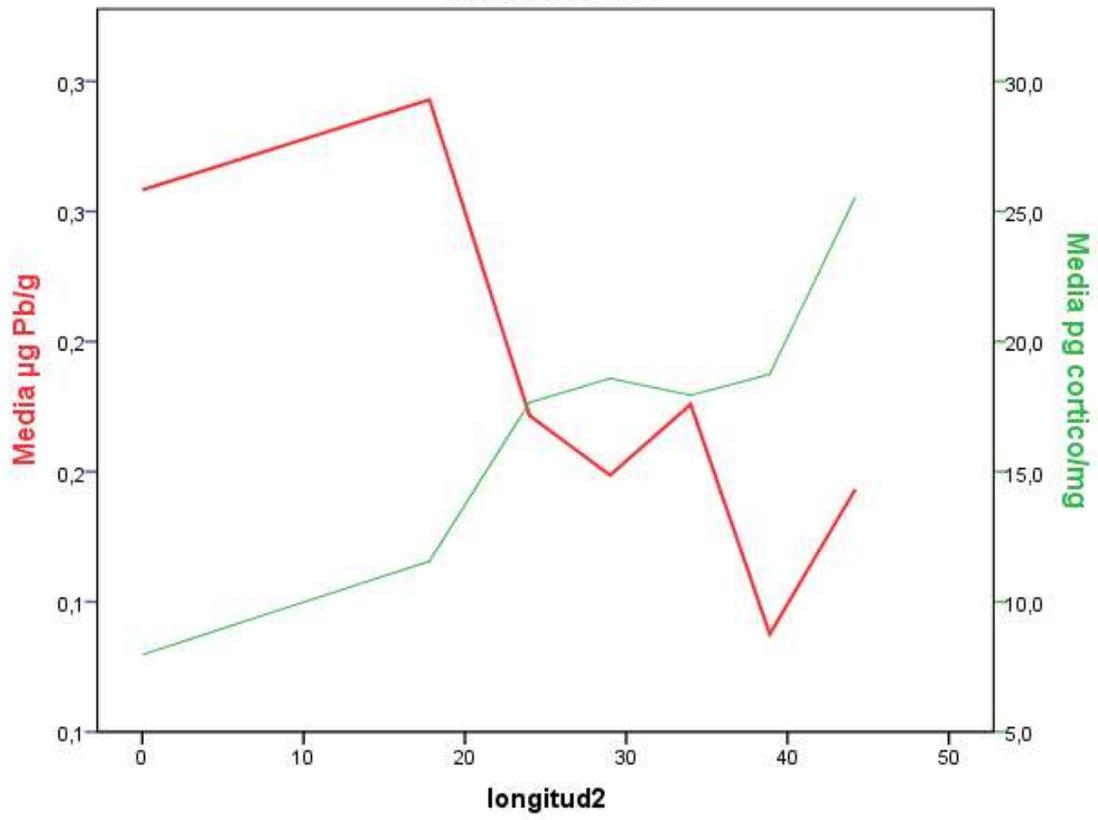
Pluma: FR0209



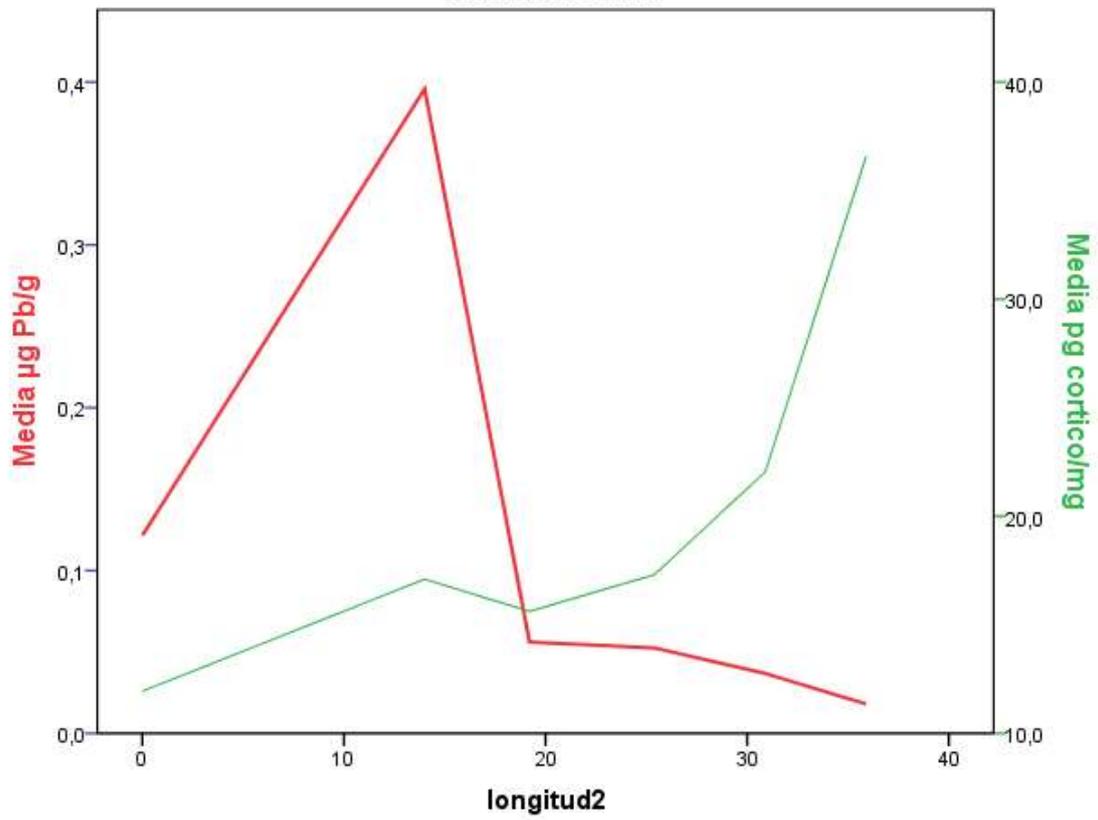
Pluma: FR0239



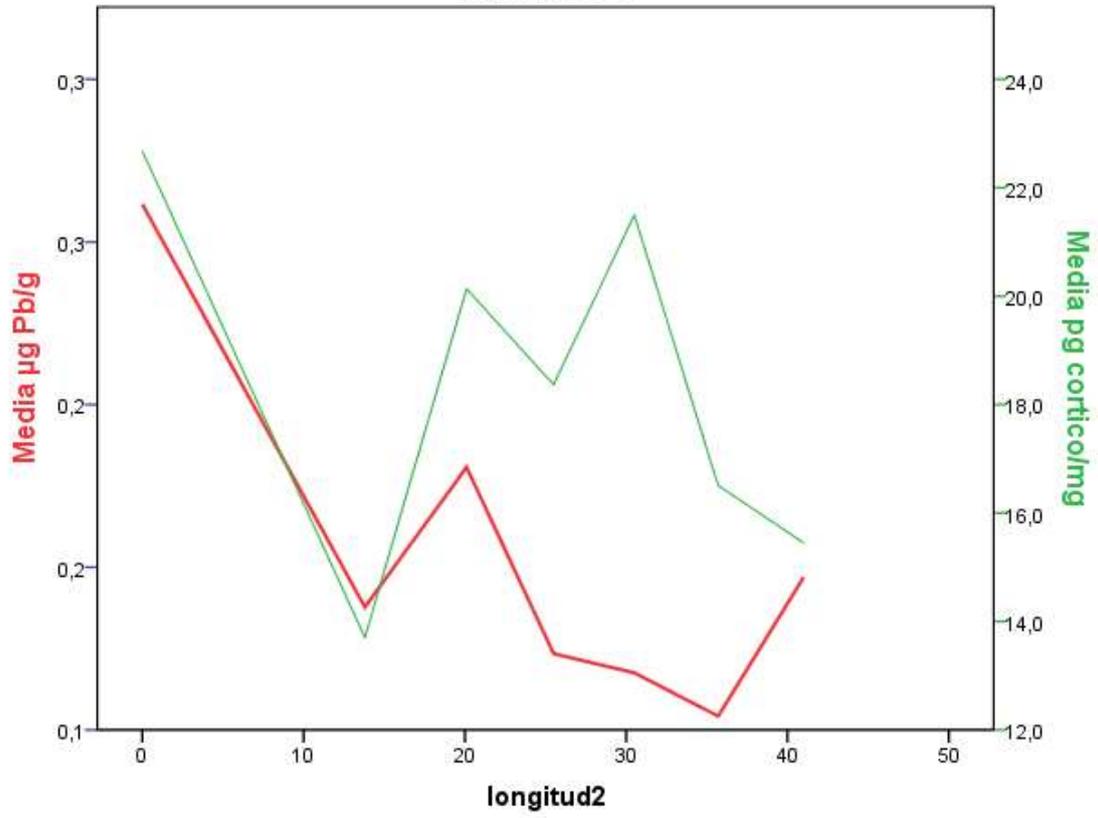
Pluma: FR0243



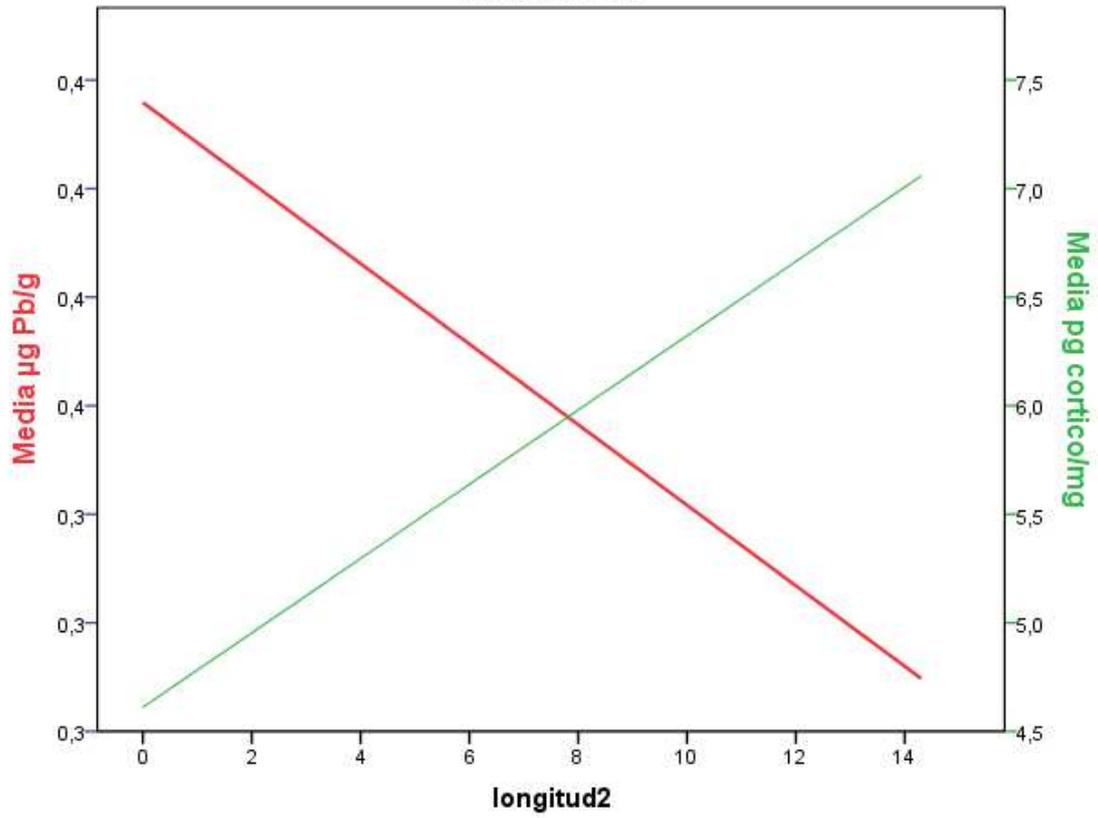
Pluma: FR0244



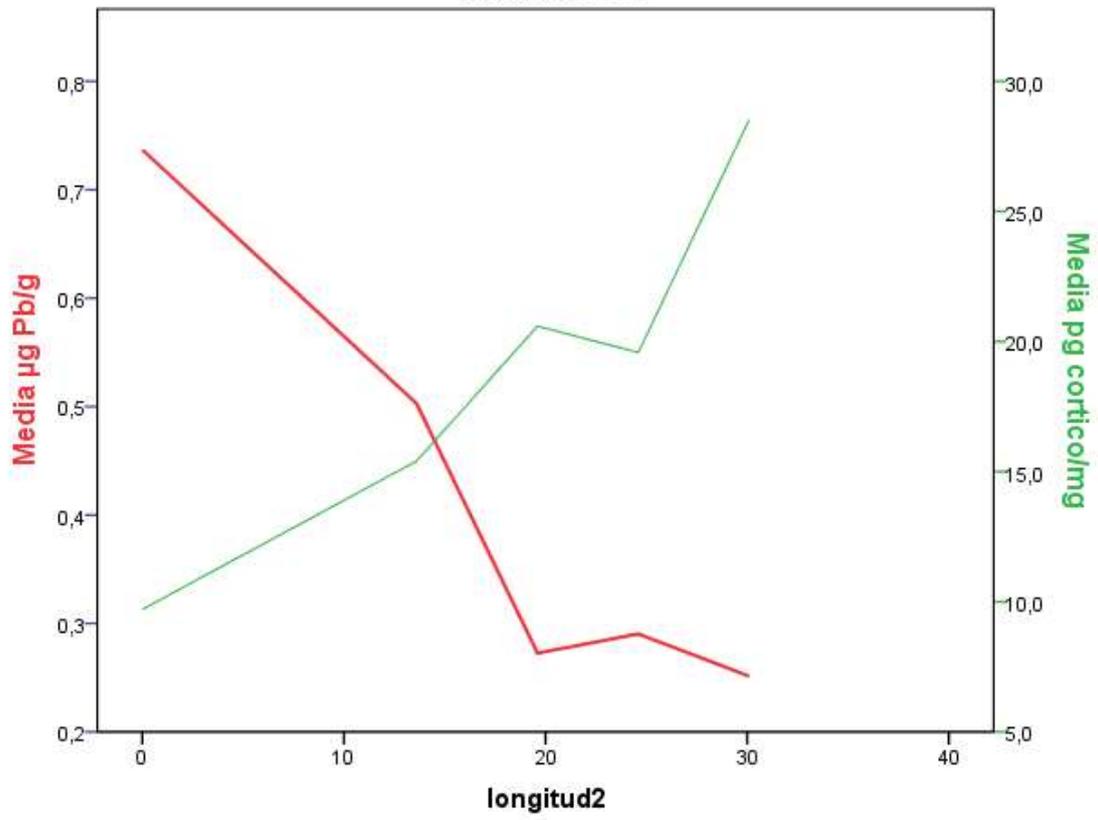
Pluma: p608



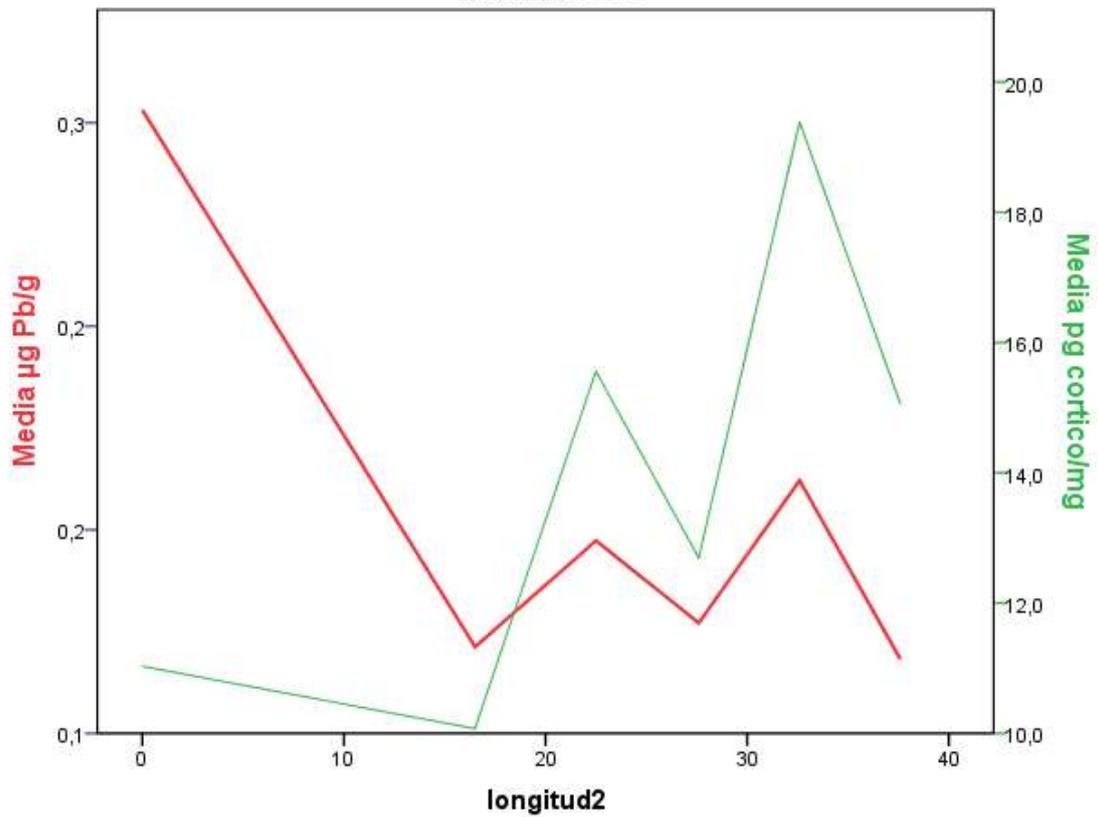
Pluma: PB01



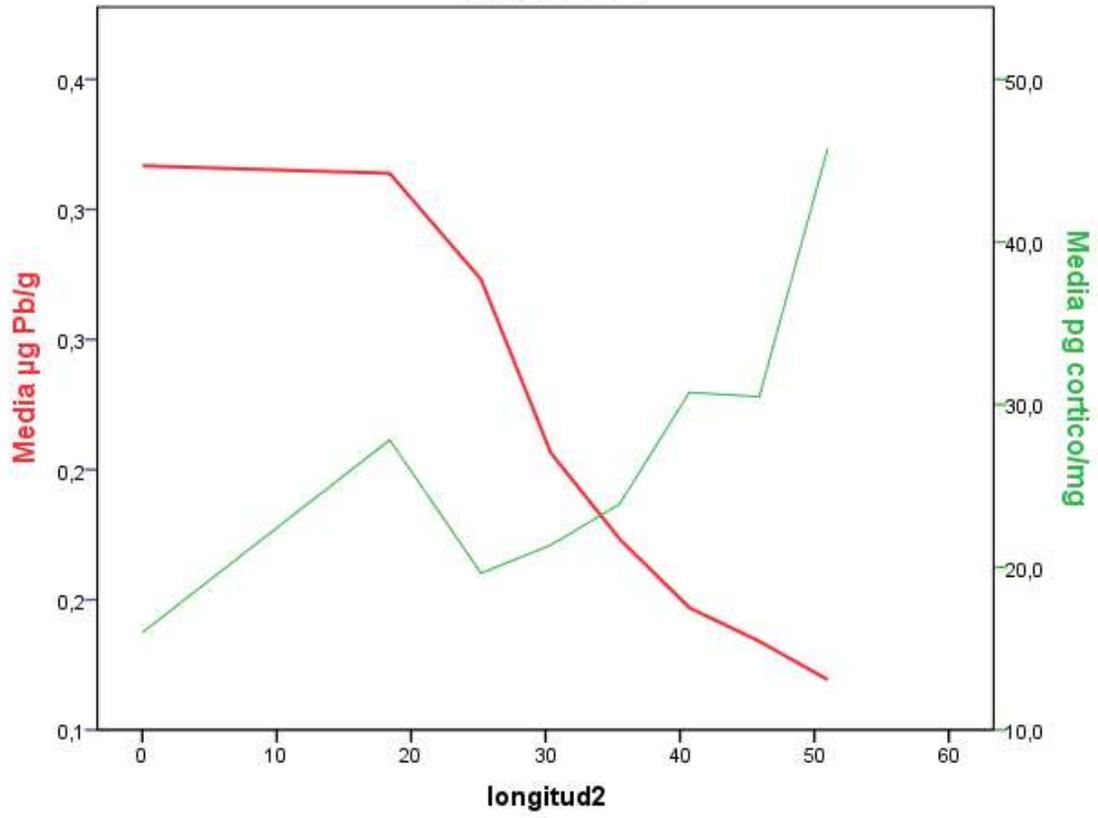
Pluma: PB02



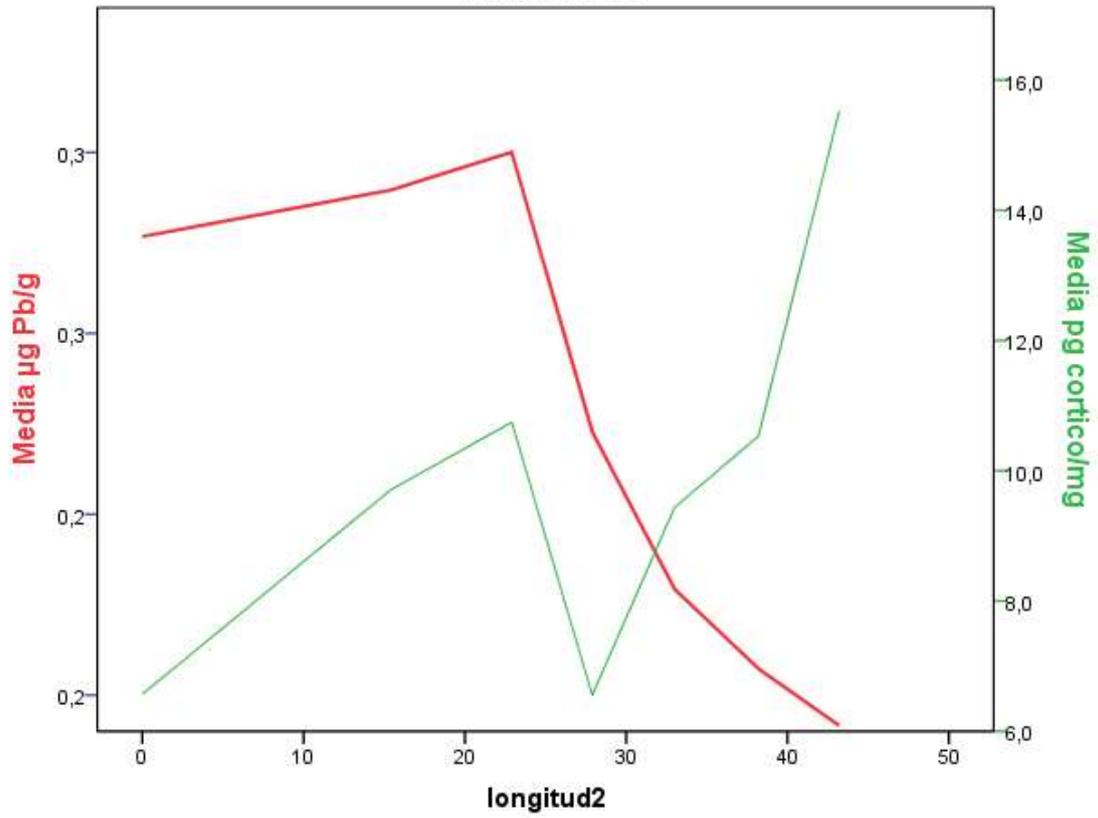
Pluma: PB03



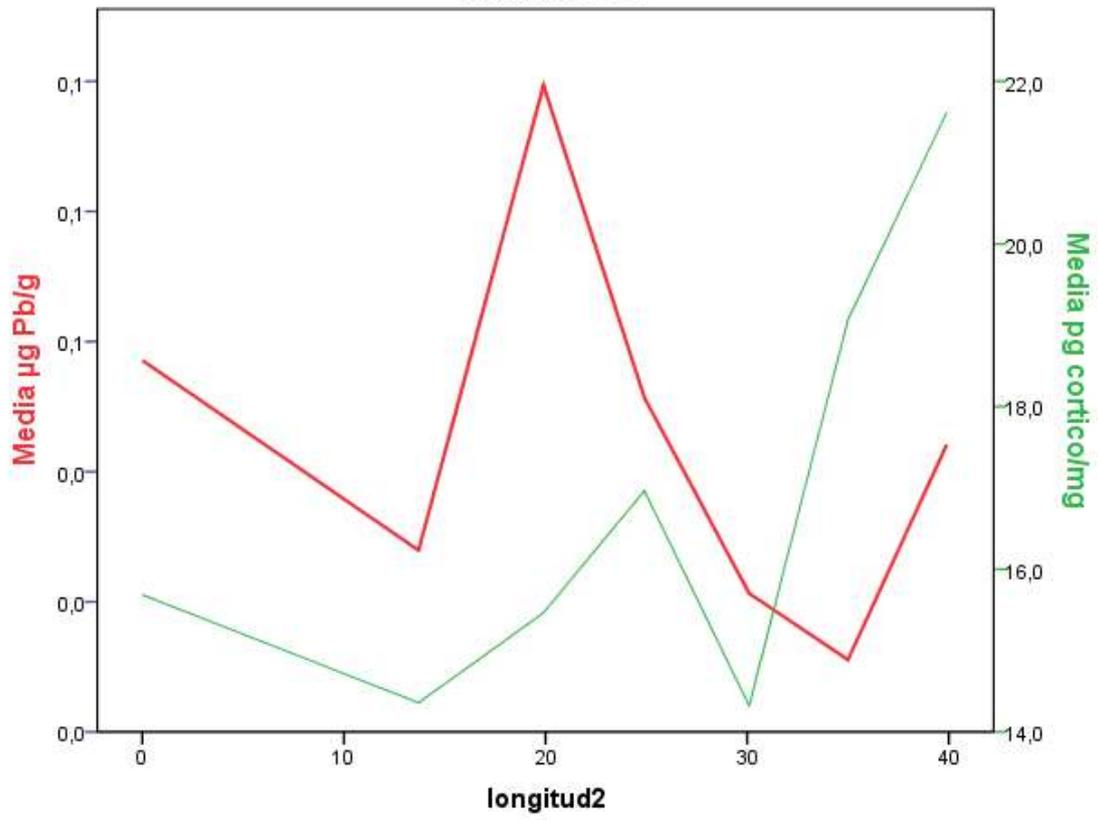
Pluma: PB04



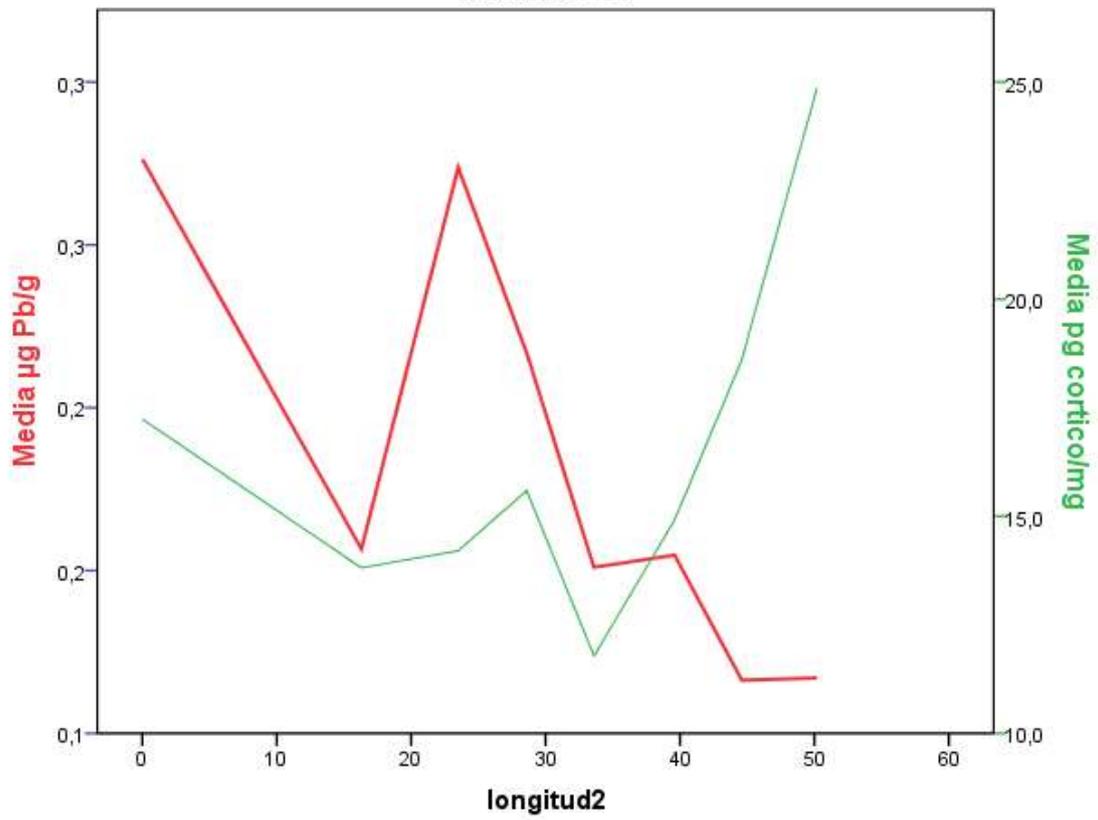
Pluma: PB05



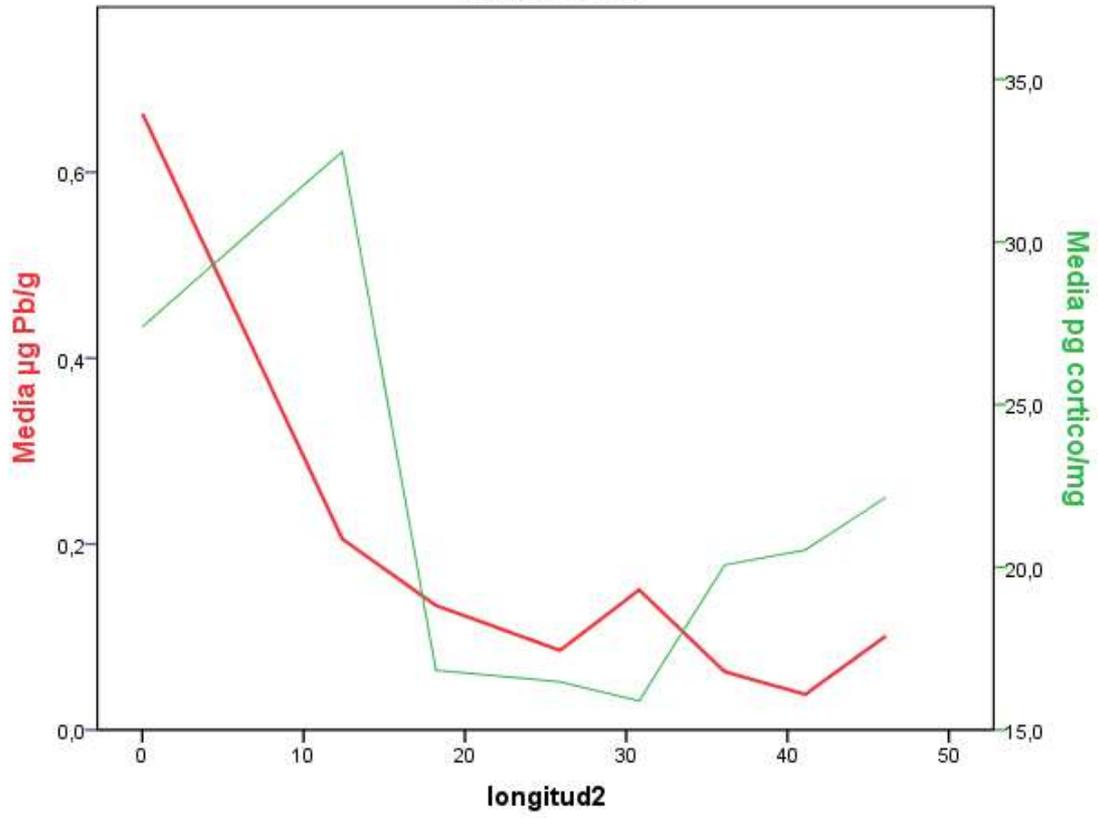
Pluma: PB06



Pluma: PB07



Pluma: VAL1



Pluma: VAN14

