

Uso de tejidos mineralizados como indicadores del efecto de la contaminación medioambiental en organismos

/ Pedro Álvarez-Lloret (1) / Alejandro Rodríguez-Navarro (1)

(1) Dpto. de Mineralogía y Petrología. Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, 18071-Granada, España.

Resumen

El uso de tejidos como indicadores o registro de diferentes parámetros ambientales y su variación temporal es una herramienta fundamental en el estudio de ecosistemas. Los tejidos mineralizados constituyen igualmente un registro de gran interés en el estudio de la exposición temporal de organismos a contaminantes. Estudios toxicológicos recientes describen como los procesos de formación de tejidos mineralizados son muy sensibles a ciertos contaminantes, en particular organoclorados y metales pesados, y en que modo pueden afectar negativamente a los procesos de calcificación de tejidos. Así, el efecto y los mecanismos de interacción de estos contaminantes en organismos se pueden estudiar mediante el análisis de las alteraciones que estas sustancias producen en la composición de tejidos mineralizados y en su mineralización, siendo estos materiales biogénicos una herramienta idónea y de gran sensibilidad para evaluar los efectos de la exposición a tóxicos en seres vivos.

Palabras clave: *Biomineralización, Tejido Óseo, Metales Pesados, Compuestos Organoclorados, Toxicidad.*

Key-works: *Biomineralization, Bone Tissue, Heavy Metals, Organochlorinated Compounds, Toxicity.*

1. Introducción

Los organismos son capaces de controlar la calcificación de tejidos modulando los parámetros fisicoquímicos (temperatura, grado de sobresaturación, etc...) más relevantes para el control del proceso de crecimiento de cristales (*Addadi & Weiner 1992*). Asimismo, los organismos controlan el ensamblaje ordenado de los minerales para formar tejidos con formas muy sofisticadas (p. ej., huesos, conchas de moluscos, cáscaras de huevo, cocolitos) y que adquieren unas microestructuras altamente organizadas (*Checa & Rodríguez-Navarro, 2005*). Sin embargo, la compleja regulación de los procesos de mineralización hace que la formación de estos tejidos sea susceptible a la influencia de factores externos que afectan al metabolismo del organismo. En particular, se ha determinado, mediante diferentes estudios toxicológicos, que ciertos contaminantes, en particular compuestos organoclorados y metales pesados, afectan negativamente a los procesos de calcificación de tejidos. Asimismo, producen alteraciones muy definidas que nos informan de los efectos que tienen estos contaminantes en el organismo. Entre otros efectos estos contaminantes inhiben la absorción de calcio a través de la pared gastrointestinal. Esto hace que, por ejemplo, se reduzca el espesor de la cáscara de huevo, lo cual afecta negativamente a la reproducción de ciertas especies de aves que son muy sensibles a estos contaminantes. Asimismo, algunos de estos contaminantes dañan los riñones (p. ej., Pb, Cd, Hg) y afectan al metabolismo del Ca, ya que los

riñones producen la forma activa de la vitamina D, necesaria para la absorción del Ca. También se sabe que puede afectar directamente a la remodelación de los huesos al alterar el funcionamiento normal de los osteoclastos y osteoblastos. Por otra parte, el metabolismo del hueso es dependiente de las hormonas sexuales. Así la exposición a compuestos organoclorados (p. ej., DDT, PCBs), que actúan como disruptores endocrinos, mimetizando la acción de estas hormonas afectando, en último término, a la formación y composición del hueso.

En este trabajo se describe el uso de tejidos mineralizados (p.ej., cascarones de huevo, huesos, conchas de moluscos) como indicadores del efecto que tienen los contaminantes en organismos y ecosistemas. Uno de los principales problemas que se plantean para evaluar los efectos de la contaminación es la cuantificación de su impacto en un ecosistema. Para ello se utilizan diferentes bioindicadores que permiten determinar los daños causados por los contaminantes.

2. Indicadores biológicos de toxicidad

Los términos “*bioindicador*” y “*biomonitor*” se refieren a la capacidad de un determinado organismo para emplearse con el objeto de evaluar o reflejar las condiciones de un ecosistema en un determinado período (*Baird, 1999*). La existencia o ausencia de un organismo, o sus comunidades, la alteración o modificación de sus características estructurales, su funcionamiento o interacciones con el medio, entre otras muchas variables, determinan la idoneidad de dicho ser vivo para actuar como indicador o monitor biológico de las condiciones ambientales, entre ellas la posible presencia de un determinado tóxico en el ecosistema. El término específico bioindicador se refiere únicamente a la ausencia (bioindicación negativa) o presencia (bioindicación positiva), y su abundancia específica, de un organismo como indicador cualitativo de los efectos de un determinado factor ambiental (*Landis & Yu, 2000*). Por otra parte, el término biomonitor no sólo se emplea para organismos capaces de indicar con su presencia de forma cualitativa la presencia de contaminantes o perturbaciones en el medio. Este térmi-

no también puede indicar de forma cuantitativa esta presencia en el ambiente de tóxicos, ya que las reacciones metabólicas del organismo en el medio pueden ser de alguna forma proporcionales al grado de contaminación o perturbación de dicho medio. La mayoría de los programas de seguimiento de tóxicos en el ambiente desarrollan métodos de medidas analíticas de un compuesto diana, en este caso tóxico, en un tejido específico de un organismo específico (*Wright & Welbourn, 2002*). El estudio analítico de residuos de pesticidas en tejidos de peces, o PCBs en mamíferos terrestres y aves son ejemplos de estas aplicaciones (*Kannan et al., 1998; Lind et al., 2004*).

La idoneidad de un organismo para actuar como bioindicador o biomonitor de exposición a un contaminante en un ambiente específico dependerá de numerosos factores. Entre ellos podemos destacar: (1) la adaptabilidad del organismo a los cambios producidos por el tóxico y, por tanto, la manifestación de una respuesta determinada por la exposición al tóxico, (2) las propias condiciones ambientales y su variabilidad, que determinarán la sensibilidad del organismo a la presencia del contaminante, (3) el estado de desarrollo del organismo, ya que existen etapas del ciclo vital en el organismo, generalmente estadios juveniles, en los que los organismos suelen ser más sensibles a posibles perturbaciones (*Landis & Yu, 2000*). Estos factores hacen que el empleo de un organismo para indicar la posible existencia de contaminación sea un compromiso entre especificidad, atribución de un efecto a una causa específica, y *fiabilidad*, detección de un efecto debido a la intoxicación, en sus diferentes manifestaciones (*Manahan, 1999*).

Una de las estrategias más extendidas en el estudio y seguimiento de tóxicos en el medio es la toma de muestra y análisis de tejidos y/o fluidos de organismos *biomonitores* (orina, sangre, plumas, hígados, riñones, huesos; *Drash et al., 1997*). Estas muestras biológicas actuarán como *biomarcadores* al manifestar como respuesta un cambio composicional o estructural ante la acción de un contaminante en el organismo expuesto (*Suter, 1990; Fossi, 1994*). El estudio analíti-

co de estos *biomarcadores* se emplea frecuentemente en estudios de toxicología, tanto en especies silvestres afectadas por la presencia de tóxicos como en especies de laboratorio. El término y la aplicación de *biomarcadores* se extiende a un gran número de técnicas y métodos analíticos, que abarcan tanto medidas de un posible daño a nivel celular como modificaciones de tipo fisiológico, incluyendo incluso observaciones de comportamiento tanto en organismos individuales como en comunidades *biomonitoras* (Manahan, 1999).

En la *Figura 1* se representan diversos métodos y medidas empleadas en el estudio analítico de la presencia o exposición a tóxicos (Hoffman et al., 2002). Algunos de estos métodos generales son empleados tanto en especies silvestres como en ensayos de toxicidad realizados en especies de investigación en laboratorios. Estos ensayos o test de toxicidad pueden ser empleados para examinar los efectos en diversos niveles de organización biológica e igualmente empleados en especies introducidas como monitoras o de seguimiento en un determinado ambiente.

bioindicación toxicológica de tipo molecular y/o fisiológico (McCarthy & Shugart, 1990). A este respecto podemos destacar cuatro estrategias para el análisis de la toxicidad de un contaminante y sus efectos sobre marcadores de tipo molecular y/o fisiológico:

a) Procesos enzimáticos y bioquímicos

La inhibición o inducción de la actividad de enzimas específicas en vertebrados, como por ejemplo, la acetilcolinesterasa, se ha utilizado como biomarcador de toxicidad en el medio. Existen un buen número de medidas cuantitativas en gran variedad de sistemas enzimáticos influidos por la toxicidad. Una de las ventajas que plantea esta metodología es que generalmente puede medirse directamente de muestras sanguíneas sin necesidad del sacrificio del individuo. De igual manera las proteínas, involucradas en la protección y equilibrio de determinadas estructuras y tejidos, son objeto de estudio del posible efecto de una gran variedad de tóxicos en organismos (Suter, 1990). De igual manera, existen un buen número de medidas y métodos para evaluar el posible daño del ADN, y material cromosómico asociado, debido a la exposición a contaminantes (Shugart, 1990).

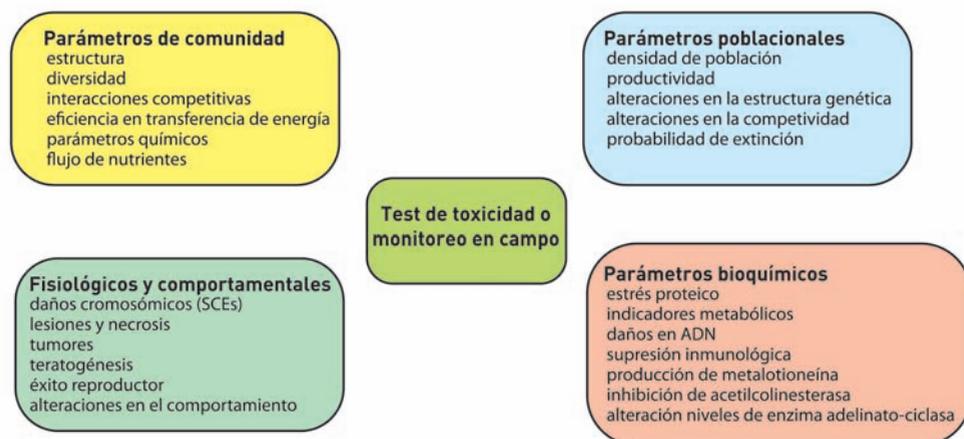


fig. 1. Métodos y medidas empleadas en biomonitorización.

En la actualidad, el estudio analítico de marcadores se ha desarrollado de forma paralela al desarrollo de técnicas y métodos de

b) Indicadores fisiológicos e histológicos

La presencia de tóxicos en el medio se

puede manifestar en algunas ocasiones como un daño aparente y observable a nivel fisiológico. Existen un gran número de procesos de necrosis y lesiones en tejidos debidos a patologías asociadas a la toxicidad de sustancias específicas. El desarrollo de procesos tumorales se ha relacionado en numerosos casos con la presencia de sustancias carcinogénicas en el medio. De igual manera el examen citogénético en células mióticas y mitóticas puede revelar o indicar pruebas de posibles daños genéticos en el organismo debidos a la exposición a sustancias tóxicas (McCarthy & Shugart, 1990).

c) Prueba o ensayos de toxicidad

En un bioensayo se controla con detalle las condiciones ambientales para conseguir que la respuesta de un organismo prueba ante los contaminantes empleados para el estudio se pueda definir inequívocamente (Shugart, 1990). Para la validez del método la extrapolación de los resultados obtenidos a través del ensayo no debe excluir las consideraciones u observaciones existentes en el medio natural. Dado que usualmente la presencia de contaminantes en el medio no es única y entre ellos pueden existir interacciones, esta metodología es de gran utilidad para aclarar los efectos tóxicos de un determinado contaminante a unas concentraciones específicas. Otra técnica de gran utilidad en los estudios de toxicidad es el cultivo de células, tanto animales como vegetales, en especial para el estudio de sustancias cancerígenas.

d) Organismos centinelas y biomonitorización in situ

La sensibilidad de determinados organismos a la existencia de contaminantes hace que éstos sean de gran utilidad como biosensores y, consecuentemente, pueden ser utilizados como *organismos centinelas* a la presencia de un tóxico (Hoffman et al., 2002). Estos organismos son de gran utilidad para demostrar la biodisponibilidad de sustancias xenobióticas en modelos realistas. Algunos ejemplos de estos organismos centinelas son: *Anodonta cygnea* (Ciccotelli et al., 1998), *Leuciscus cephalus* (Winter et al., 2005), *Tapes philippinarum* (Valbonesi et al., 2003),

Helix aspersa (Beeby & Richmond, 2002).

3. Toxicidad asociada a tejidos mineralizados

Durante la fabricación de tejidos mineralizados (v.gr. huesos, cáscaras de huevo, conchas de moluscos) se combinan procesos biológicos y fisicoquímicos muy complejos y exquisitamente regulados por el organismo (Addadi & Weiner, 1992). La formación, composición y microestructura de tejidos mineralizados puede verse directamente afectada por cambios fisiológicos del organismo o indirectamente por agentes externos, como la contaminación, que igualmente pueden inducir cambios fisiológicos en el organismo. Por otra parte, la disposición de los cristales que mineralizan el tejido y la microtextura de éste están en gran parte determinados por procesos de autoorganización, que generan un patrón típico textural (Rodríguez-Navarro & García-Ruiz, 2000; Checa & Rodríguez-Navarro, 2005). Así, cualquier variación de este patrón típico va a ser indicativo de la presencia de factores externos que inhiben o modifican el crecimiento de los cristales (p.ej. contaminantes, variaciones composicionales de la matriz orgánica; Ahmed et al., 2005). La microestructura y composición de los tejidos mineralizados podrá variar con la edad, con la alimentación, estado de salud o posible exposición a contaminantes (Rodríguez-Navarro et al., 2002a, b; 2006; Ahmed et al., 2005). Por tanto, la caracterización de la microestructura y composición de los tejidos mineralizados puede ayudarnos a entender el modo en que afectan diferentes factores fisiológicos y externos a la formación de estos biomateriales.

Mediante diferentes estudios toxicológicos se ha demostrado que ciertos contaminantes, en particular organoclorados y metales pesados, afectan negativamente en los procesos de calcificación de tejidos (Puzas et al., 1992; Berglund et al., 2000). Estos contaminantes inhiben la absorción normal del calcio a través de la pared gastrointestinal haciendo, por ejemplo, que se reduzca el espesor de la cáscara de huevo, lo cual afectará directamente al éxito reproductor de ciertas especies de aves sensibles a la existencia a estos contaminantes (Cooke, 1973;

Lundholm, 1991). Asimismo, alguno de estos contaminantes, como es el caso del plomo, cadmio o mercurio, pueden alterar negativamente la función de los riñones, afectando igualmente el metabolismo del calcio, al ser estos órganos los responsables de producir la forma activa de la vitamina D, necesaria para la absorción del calcio (Scheuhammer, 1987). De igual forma, la exposición a contaminantes puede afectar directamente en la remodelación de los huesos al alterar el funcionamiento celular normal de osteocitos y osteoblastos. Por otra parte, el metabolismo del tejido óseo es dependiente de las hormonas sexuales. Por ejemplo, después de la menopausia u ovariectomía ocurre una aceleración de la pérdida de densidad ósea causada por una deficiencia en estrógenos. De manera análoga, la exposición a compuestos organoclorados (p. ej. DDT, PCBs), que actúan como disruptores endocrinos, puede afectar la correcta formación y composición del tejido óseo (Andrews, 1989; Gould et al., 1997; Lind et al., 2000). Los efectos son muy variados (pérdida de dientes, disminución o aumento de la densidad ósea, osteoporosis, etc.), al ser la respuesta específica diferente para cada contaminante y organismo afectado. En cualquier caso, sus efectos se manifiestan en una calcificación *anómala* de estos tejidos mineralizados. Así, los efectos de estos contaminantes se pueden evaluar mediante el análisis de la composición de tejidos mineralizados y su grado de mineralización.

El empleo de tejidos como registro de diferentes parámetros ambientales y su variación temporal ha sido hasta el momento ampliamente estudiado (Schone et al., 2003; Hedges et al., 2004). A través del análisis de estos tejidos es posible incluso determinar la dieta y origen geográfico de organismos (Romanek et al., 2000; Graves et al., 2002). Los tejidos mineralizados constituyen un registro de gran interés en el estudio de la exposición temporal de organismos a contaminantes o sustancias tóxicas (Gaines et al., 2002; Ferrara et al., 2005; Pain et al., 2007). Estos tejidos pueden llegar incluso a acumular buena parte del tóxico al que se han visto expuestos, como el caso del plomo en el tejido óseo. Muchos de estos organis-

mos acumulan en sus tejidos los tóxicos a los que se han encontrado expuestos llegando incluso a desarrollar mecanismos de desintoxicación (Gaines et al., 2002; Punshon et al., 2003). El estudio de tejidos mineralizados para describir procesos de toxicidad de contaminantes y su relación en la calcificación de tejidos es un área de investigación emergente en las últimas décadas (Lind et al. 2000; 2004; Rodríguez-Navarro et al., 2002a,b). En la actualidad, el estudio de la composición química y estructural de un buen número de tejidos mineralizados es empleado para complementar la información obtenida mediante diferentes parámetros bioquímicos modificados por la existencia de una posible toxicidad (Lind et al., 1999; Rodríguez-Navarro et al., 2002a,b; 2006; Lundberg et al., 2007).

El calcio participa en un gran número de funciones fisiológicas en organismos. De entre todos estos procesos en los que el calcio participa podemos destacar su papel fundamental como constituyente esencial de los biominerales formados por sales de calcio como carbonatos, fosfatos y oxalatos. El calcio se localiza en un 99% en el hueso, donde realiza una función de protección de órganos vitales y de soporte rígido, pero articulado del organismo mientras que el 1% restante se distribuye en los tejidos blandos y plasma (Tortora, 1996). Esta pequeña cantidad de calcio presente en las células sostiene funciones vitales del organismo como son la secreción y acción efectora hormonal, la contracción muscular, neurosecreción y conducción nerviosa, metabolismo celular, etc. (Fukagawa & Kurokawa, 2002). Además del calcio intracelular, el calcio presente en los líquidos extracelulares participa en la regulación de la coagulación sanguínea y mantiene la integridad estructural de las membranas (Fukagawa & Kurokawa, 2002). Estas importantes funciones del calcio explican como las perturbaciones en la homeostasis cálcica en organismos puede llevar a ocasionar trastornos graves (alteraciones de la excitabilidad nerviosa, paresia o tetania muscular, etc.) y, finalmente, a la muerte cuando dichas perturbaciones alcanzan un valor crítico. Por lo tanto, el mantenimiento del nivel de calcio constante en el organismo es de importancia

vital. Así, el hueso actúa como un depósito muy importante de calcio necesario para mantener la homeostasis de los niveles séricos. De esta manera, los procesos toxicológicos que puedan afectar a la correcta absorción o movilización del calcio por los organismos afectarán consecuentemente a la normal mineralización de los tejidos (p. ej. cáscara de huevo, huesos...) y/o su homeostasis. Los metales pesados (p. ej. Hg, Pd o Cd) producen daño celular y la inhibición de la actividad enzimática: síntesis del grupo hemo (Petering & Tepper, 1976; Rubio *et al.*, 2004). Debido a su nefrotoxicidad, la exposición a estos elementos puede inducir una descalcificación de los huesos. Por ejemplo, el plomo se metaboliza de forma muy similar al calcio, almacenándose fundamentalmente en el tejido óseo (Scheuhammer, 1987).

Los PCBs son una clase de compuestos químicos tóxicos de gran persistencia, liposolubles y fácilmente asimilables por organismos. Entre sus efectos tóxicos destacan los relacionados con la alteración del sistema endocrino (Cooke *et al.*, 2002). En particular estos compuestos afectan adversamente al funcionamiento normal de las hormonas tiroideas (Portigal *et al.*, 2002; Lind *et al.*, 2004). Entre estas alteraciones encontramos: (1) cambios histológicos en las glándulas tiroideas y disrupción en el procesamiento

de coloide folicular necesario para la producción normal y secreción de las hormonas por el tiroides; (2) reducción de los niveles de hormonas T3 y T4 y aumento de las tasas de eliminación de estas hormonas, pudiendo provocar estados hipotiroideos; (3) incremento de la actividad de UDP-GT en el hígado, fundamental en el mecanismo de eliminación de las hormonas T3 y T4; (4) descenso de la actividad de yodotironina deiodinasa, indispensable en la producción de la hormona T3. Entre las hormonas producidas por las glándulas tiroideas igualmente, junto a la T3 y la T4, destaca la calcitonina (Landis & Yu, 2000). Esta hormona interviene en la regulación del calcio, y su actividad principal es inhibir la resorción ósea (depósito y eliminación de calcio y fósforo en el hueso) mediante la reducción de la actividad de los osteoclastos (células que se encuentran en el hueso y tienen actividad en la absorción y remodelación del hueso). La alteración de las cantidades de hormonas segregadas y eliminadas por las glándulas tiroideas debidas a la toxicidad de los PCBs modifica la formación de tejidos mineralizados que están regulados por estas hormonas. Por otra parte las dioxinas (p.ej. TCDD) son compuestos organoclorados muy tóxicos debido a que ejercen sus efectos a través de la unión de alta afinidad con una proteína celular específica conocida como el receptor arilo de hidrocarburo (AhR).

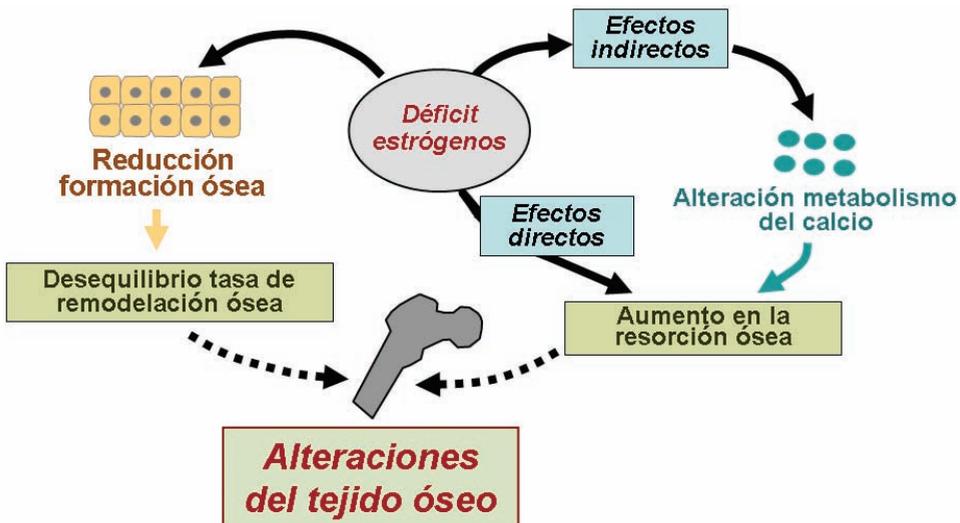


fig. 2. Mecanismos de alteración del tejido óseo por la exposición a agentes tóxicos.

El receptor AhR es un factor de transcripción intracelular activado por ligando y que está involucrado en la regulación de la expresión de un gran número de genes. Estudios recientes con células y ratones transgénicos con un receptor AhR constitutivamente activo, o con ratones en los cuales el receptor AhR fue destruido, sugieren que el receptor AhR es una proteína reguladora clave del desarrollo normal del hueso y la homeostasis (Andersson *et al.*, 2002, 2003). Un estudio *in vitro* reciente mostró como el TCDD reducía la expresión de la osteopontina (Wejheden *et al.*, 2006). La reducción de osteopontina, cuya función en el tejido óseo está vinculada con la adherencia celular y la resorción ósea, puede estar relacionada con una alteración de los procesos de formación del tejido óseo (Ohyama *et al.*, 2004).

En definitiva, las alteraciones en los tejidos mineralizados por la exposición a contaminantes se deben en gran medida a la capacidad que poseen ciertos contaminantes de alterar el metabolismo de organismos, y en particular los niveles de hormonas que regulan la mineralización y remodelación del tejido óseo. Esta alteración puede afectar de forma indirecta o directa a la formación del tejido óseo, por ejemplo disminuyendo la absorción de calcio y/o modificando la activi-

dad de osteoclastos o osteoblastos, células implicadas en los mecanismos de formación y resorción ósea, produciendo una mineralización anómala del tejido óseo. Por ejemplo, un déficit de estrógenos, producido por la exposición a ciertos tóxicos (organoclorados), modifica la actividad normal de osteoblastos y osteoclastos, dando lugar, generalmente, a una reducción en la formación del tejido y consecuentemente desequilibrando la tasa normal de remodelación ósea y una composición anómala del tejido (*ver figura 2*).

Asimismo, la exposición a ciertos contaminantes (metales pesados y compuestos organoclorados) produce una alteración de los niveles de vitamina D, de tiroxina y otras hormonas, provocando una alteración de la actividad normal de osteoblastos y osteoclastos, así como un descenso en la capacidad del organismo para absorber calcio a través de la pared gastrointestinal. Diferentes estudios muestran que estas alteraciones producen, en poblaciones expuestas a la contaminación, una reducción del grado de mineralización y de la densidad de masa ósea, así como una mayor maduración ósea (p. ej., incremento de la cristalinidad del apatito, principal constituyente mineral del hueso) en comparación a la encontrada en poblaciones de zonas de referencia no contaminadas.



fig. 3. Esquema explicativo de los efectos de la exposición a agentes tóxicos en el tejido óseo.

Algunos de estos efectos tóxicos se resumen en el siguiente diagrama (Fig. 3).

A continuación se describen los resultados de diferentes estudios tanto en especies silvestres expuestas a la contaminación ambiental, como animales modelo expuestos de forma controlada a tóxicos en experimentos de laboratorio. En todos los casos, los efectos de la exposición a diferentes agentes tóxicos (metales pesados y organoclorados) se manifiesta en una alteración de la mineralización y composición del tejido óseo.

poniendo de manifiesto la existencia de una ingestión crónica y el efecto de bioacumulación de la concentración de plomo en hueso con la edad del individuo. Esta acumulación produjo una alteración muy significativa del grado de mineralización del tejido óseo, como se pudo determinar mediante el análisis mediante espectrometría de infrarrojos (FTIR) de huesos. El grado de mineralización de los huesos era tanto menor cuanto mayor era la concentración de plomo en el tejido óseo. El plomo es nefrotóxico y puede alterar la formación de la forma activa de la vitami-

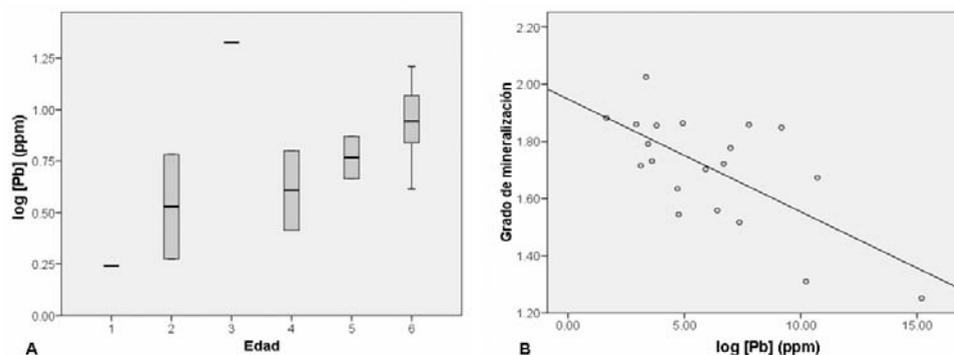


fig. 4. Efectos de la contaminación por plomo en una población de alimoches. A) Concentración de plomo en hueso en función de la edad. B) Grado de mineralización del hueso en función de la concentración de plomo en hueso.

Estudio 1. Efectos de la exposición al plomo en el tejido óseo de una población de alimoches (*Neophron percnopterus*)

El hueso es un indicador muy idóneo para determinar el grado de exposición temporal al plomo en especies de vida prolongada. El plomo se acumula principalmente en este tipo de tejidos (aproximadamente el 95 % del plomo absorbido por el organismo se deposita en el esqueleto). Esto se pudo constatar en un caso de estudio de una población de alimoches (*Neophron percnopterus*) expuesta a la contaminación por plomo, debido a la ingestión de perdigones y fragmentos de munición (Gangoso et al., 2009). Los análisis de plomo en el tejido óseo de los individuos de la población analizados mostraron una mayor concentración de este metal cuanto mayor eran los niveles de contaminación en la zona. Asimismo, se constató que la concentración de este metal en el tejido óseo aumentaba con la edad de los individuos,

na D, necesaria para la absorción del calcio por el organismo y para la regulación de la mineralización ósea, lo que explicaría la reducción en el grado de mineralización del hueso observada en las aves expuestas a este tipo de contaminante.

Estudio 2. Efectos de la exposición a mercurio y policlorobifenilos (PCBs) en la composición química mineral del hueso en una población de gallinuela de manglar (*Rallus longirostris*).

Al estudiar una población de gallinuela de manglar (*Rallus longirostris*) localizada en una zona de marismas, en la península de Brunswick (Georgia, EEUU), altamente contaminada con mercurio y PCBs procedentes de una industria química cercana, se observó que esta población presentaba una alteración de la composición del tejido óseo y que estos efectos eran directamente proporcionales al grado de exposición de los individuos a contaminantes organoclorados (Rodríguez-

Navarro et al., 2006). En particular, los datos composicionales obtenidos mediante espectrometría de infrarrojos (FTIR) muestran una correlación significativa entre el contenido de la parte mineral del hueso en fosfatos con diferentes grado de cristalinidad (bandas a 985 y 1056 cm^{-1}) y los niveles de PCB encontrados en los individuos analizados. En la *figura 4* se observa una relación inversa entre la proporción de fosfato de baja cristalinidad (sub-banda a 985 cm^{-1}) en el mineral del hueso y las concentraciones de PCB ana-

lizado de procolágeno I) y aumento de los niveles del marcador CTX (telopéptido C-terminal del colágeno tipo I; Lind et al., 2009). Estos resultados están correlacionados con diferentes parámetros de composición química y mineral del hueso e indicadores de densidad ósea obtenidos mediante FTIR y tomografía computerizada periférica cuantitativa (pQCT) (*Fig.6*), respectivamente. Por otra parte, se ha estudiado como la exposición a organoclorados (PCB126) afecta a diferentes parámetros indicadores de densidad ósea, obtenidos mediante pQCT, y que indican como estos

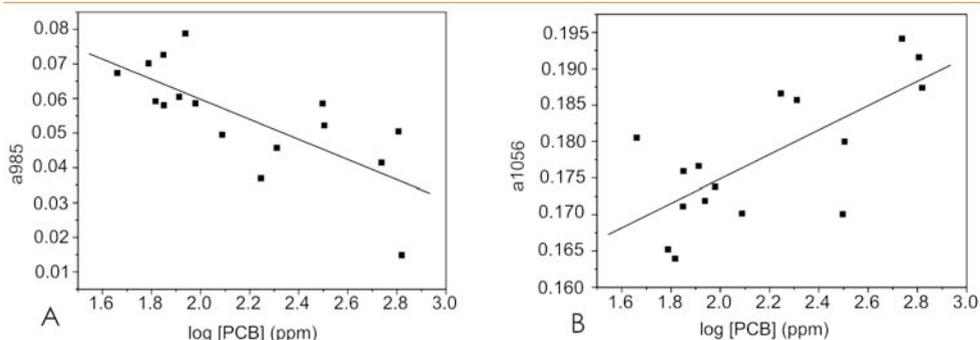


fig. 5. Efecto de los niveles de PCB en la composición de la parte mineral del hueso en gallinuelas de manglar medida mediante espectrometría de infrarrojos. A) Contenido de la parte mineral en fosfato pobremente cristalino. B) Contenido de la parte mineral en fosfato altamente cristalino.

lizadas en cada individuo (*Fig 5A*), así como una relación directa entre la proporción de fosfato de alta cristalinidad (sub-banda a 1056 cm^{-1}) (*Fig 5B*) y las concentraciones de PCB en cada individuo.

Estudio 3. Efectos de la exposición a organoclorados (PCB y TCDD) en la densidad ósea y en marcadores de remodelación ósea en organismos expuestos.

Los análisis de las muestras de hueso en ratas del tipo Sprague-Dawley indican como el tratamiento con TCDD (dosis única $50\text{ }\mu\text{g/Kg}$) y tras un período muy corto de tiempo (5 días desde la exposición) es suficiente para provocar unas alteraciones muy notables en el organismo (Lind et al., 2009). En particular, se observó una disminución en los niveles de formación ósea, inferidos a través de los análisis de los niveles de marcadores de remodelado óseo, tal y como se refleja en la disminución de los niveles del marcador de la actividad osteoblástica PINP (propéptido aminoter-

tóxicos producen una reducción del área del hueso metabólicamente más activo (p. ej. hueso trabecular; Lind et al., 1999; 2000; 2004). Adicionalmente, se han estudiado los efectos que produce la exposición a PCB126 sobre los niveles de vitamina D y tiroxina (FT4) sérica, que son marcadores de los procesos de formación del tejido óseo (*Fig. 7*). Se observa que existe un menor grado de mineralización y una alteración importante de las propiedades cristalinas del hueso, a partir de datos de FTIR y TEM (Alvarez-Lloret et al., 2009). Este tipo de alteraciones están también directamente relacionados con una reducción de las concentraciones de estas hormonas séricas en el organismo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación a través del proyecto del Ministerio con referencia CTM 2007-65713 y a las ayudas a grupos de investigación RNM-179 de la Junta de Andalucía.

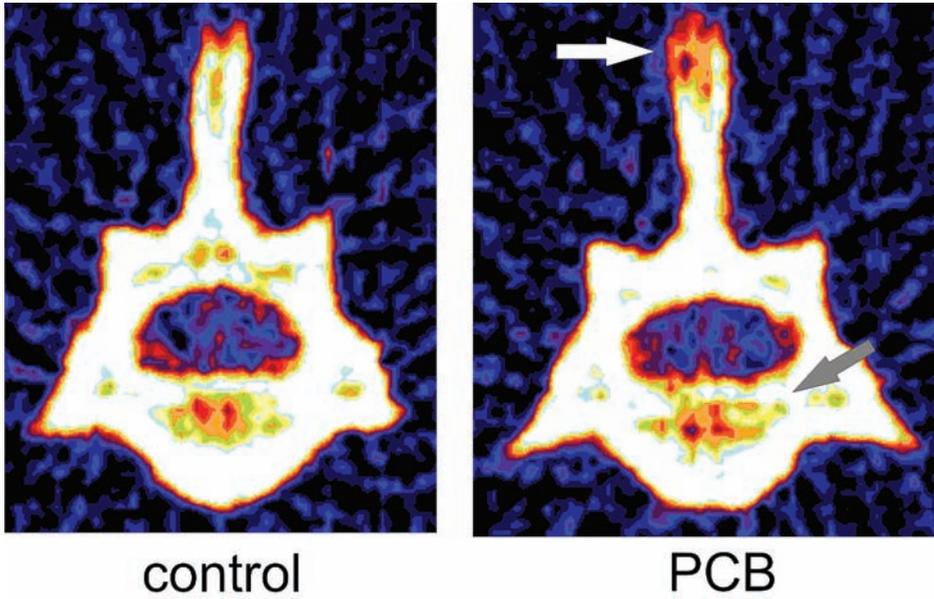


fig. 6. Imágenes de tomografía computada periférica cuantitativa (pQCT), en las que se observa como en los organismos expuestos a organoclorados (PCB126) presentan una reducción del área del hueso trabecular (zonas más afectadas indicadas flechas).

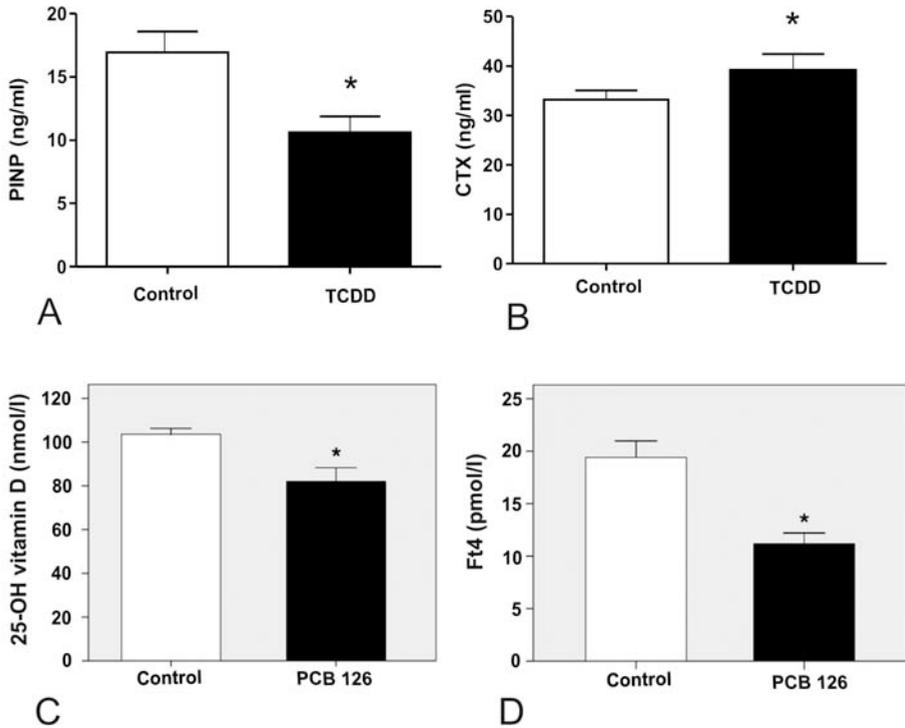


fig. 7. Efecto de la exposición a diferentes sustancias tóxicas (TCDD y PCBs) en los niveles de diferentes biomarcadores de actividad del tejido óseo (a) PNP; b) CTX; c) vitamina D; d) Ft4 en ensayos de toxicidad con ratas de tipo Sprague-Dawley.

Referencias

- Addadi, L. & Weiner, S. (1992) Control and design principles in biological mineralization. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 31, 153-169.
- Ahmed, A.M.H., Rodríguez-Navarro, A.B., Vidal, M.L., Gautron, J., García-Ruiz, J.M. & Nys, Y. (2005) Changes in eggshell mechanical properties, crystallographic texture and in matrix proteins induced by moult in hens. *Brit. Poultry Sci.*, 46, 268-279.
- Álvarez-Lloret, P., Lind, P.M., Nyberg I., Örborg, J. & Rodríguez-Navarro, A.B. (2009) Effects of 3,3',4,4', 5 - pentachlorobiphenyl (PCB126) on vertebral bone mineralization and on thyroxin and vitamin D levels in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.*, 187 (2), 63-68.
- Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Hanberg, A. & Poellinger, L. (2002) A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9990-9995.
- Andersson, P., Ridderstad, A., McGuire, J., Pettersson, S., Poellinger, L. & Hanberg, A. (2003) A constitutively active aryl hydrocarbon receptor causes loss of peritoneal B1 cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 302, 336-341.
- Andrews, J.E. (1989) Polychlorinated biphenyl (Aroclor® 1254) induced changes in femur morphology calcium metabolism and nephrotoxicity. *Toxicology*, 57, 83-96.
- Baird, C. (1999) *Environmental Chemistry*, WH Freeman & Co.
- Beeby, A. & Richmond, L. (2002) Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecol. Indic.*, 1, 261-270.
- Berglund, M., Akesson, A., Bjellerup, P. & Vahter, M. (2000) Metal-bone interactions. *Toxicol. Lett.*, 112-113, 219-225.
- Checa, A.G. & Rodríguez-Navarro, A. (2005) Self-organisation of nacre in the shells of Pterioidea. *Biomaterials*, 26, 1071-1079.
- Ciccotelli, M., Crippa, S. & Colombo, A. (1998) Bioindicators for toxicity assesment of effluents from a wastewater treatment plant. *Chemosphere*, 3, 2823-2832.
- Cooke, A.S. (1973) Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants. *Environ. Pollut.*, 4, 85-152.
- Cooke, P.S., Peterson, R.E. & Hess, R.A. (2002) Endocrine disruptors. *Handbook of Toxicologic Pathology (Second Edition)* 501-528.
- Drash, G., Wanghofer, E. & Roeder, G. (1997) Are blood, urine hair and muscle valid biomonitor for the internal burden of men with heavy metals mercury, lead and cadmium?. *Trace Elem. Electroly.*, 14, 116-123.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M. & Funari, E. (2005) Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy). *Chemosphere*, 59, 1145-1150.
- Fossi, M.C. (1994) Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Health Persp.*, 102, 49-54.
- Fukagawa, M. & Kurokawa, K. (2002) Calcium Homeostasis and Imbalance. *Nephron*, 92, 4-45.
- Gaines, K.F., Romanek, C.S., Boring, C.S., Lord, C.G., Gochfeld, M. & Burger, J. (2002) Using raccoons as an indicator species for metal accumulation across trophic levels: A stable isotope approach. *J. Wildlife Manage.*, 66, 811-821.
- Gangoso, L., Álvarez-Lloret, P., Rodríguez-Navarro, A.B., Mateo, R., Hiraldo, F. & Donazar, J.A. (2009) Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources. *Environ. Pollut.*, 157 (2), 569-574.
- Graves, G.R., Romanek, C.S. & Rodríguez-Navarro, A.B. (2002) Stable isotope signature of philopatry and dispersal in a migratory songbird. *P. Natl. Acad. .Sci. USA*, 99, 8096- 8100.
- Gould, J.C., Cooper K.R. & Scanes, C.G. (1997) Effects of polychlorinated biphenyl mixtures and three specific congeners on growth and circulating growth-related hormones. *Gen. Comp. Endocr.*, 106, 221-230.
- Hedges, R.E.M., Stevens, R.E. & Richards, M.P. (2004) Bone as a stable isotope archive for local

- climatic information. *Quaternary Sci. Rev.*, 23, 959-965.
- Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A.Jr. & John Cairns, J.Jr. (2002) *Handbook of Ecotoxicology, Second Edition*.
- Kannan, K.N., Stafford, R., Masson G.R., Tanabe, S. & Giesy, J.P. (1998) Bioaccumulation and toxic potential of extremely hydrophobic polychlorinated biphenyl congeners in biota collected at a superfund site contaminated with Aroclor 1268. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1214-1221.
- Landis, W.G. & Yu, M-H. (2000) *Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems*. Lewis Publishers. Springer Netherlands.
- Lind, P.M., Eriksen, E.F., Sahlin, L., Edlund, M. & Örborg, J. (1999) Effects of the antiestrogenic environmental pollutant 3,3',4,4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB #126) in rat bone and uterus: diverging effects in ovariectomized and intact animals. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 154, 236-244.
- ___, Larsson, S., Oxlund, H., Hakansson, H., Nyberg, K., Eklund, T. & Örborg J. (2000) Change of bone tissue composition and impaired bone strength in rats exposed to, 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB126). *Toxicology*, 150, 41-51.
- ___, Eriksen, E.F., Lind, L., Örborg, J. & Sahlin, L. (2004) Estrogen supplementation modulates effects of the endocrine disrupting pollutant PCB126 in rat bone and uterus: Diverging effects in ovariectomized and intact animals. *Toxicology*, 199, 129-136.
- ___, Wejheden, C., Lundberg, R., Álvarez-Lloret, P., Hermsen, S.A.B., Rodríguez-Navarro, A.B., Larsson, S., Moncek, F. & Rannug, A. (2009) Short-term exposure to dioxin impairs bone tissue in male rats. *Chemosphere*, 75 (5), 680-684.
- Lundberg, R., Jenssen, B.M., Leiva-Presa, A., Ronn, M., Hernhag, C., Wejheden, C., Larsson, S., Orberg, J. & Lind, P.M. (2007) Effects of short-term exposure to the DDT metabolite p,p'-DDE on bone tissue in male common frog (*Rana temporaria*). *J. Toxicol. Env. Heal. A*, 70, 614-619.
- Lundholm, C.E. (1991) Influence of chlorinated hydrocarbons, Hg²⁺ and methyl-Hg⁺ on steroid hormone receptors from eggshell gland mucosa of domestic fowls and ducks. *Arch. Toxicol.*, 65, 220-227.
- Manahan, S.E. (1999) *Environmental Chemistry 7th. Edition*. Lewis. Publishers, New York.
- McCarthy, J.F. & Shugart, L.R. (1990) *Biological Markers of Environmental Contamination*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Ohyama, Y., Akira, N., Yukiko, M., Teruo, A. & Masaki, N. (2004) Spatiotemporal association and bone morphogenetic protein regulation of Sclerostin and Osterix expression during embryonic osteogenesis. *Endocrinology*, 145, 4685-4692.
- Pain, D.J., Carter, I., Sainsbury, A.W., Shore, R.F., Eden, P., Taggart, M.A., Konstantinos, S., Walker, L.A., Meharg, A.A. & Raab, A. (2007) Lead contamination and associated disease in captive and reintroduced red kites *Milvus milvus* in England. *Sci. Total Environ.*, 376, 116-127.
- Petering, H.G. & Tepper, L.B. (1976) Pharmacology and toxicology of heavy metals: Mercury. *Pharmacol. Ther. A*, 1, 131-151.
- Portugal, C.L., Cowell, S.P., Fedoruk, M.N., Butler, C.M., Rennie, P.S. & Nelson C.C. (2002) Polychlorinated biphenyls interfere with androgen-induced transcriptional activation and hormone binding. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 179, 185-194.
- Punshon, T., Gaines, K.F., Bertsch, P.M. & Burger, J. (2003) Bioavailability of uranium and nickel to vegetation in a contaminated riparian ecosystem. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 1146-1154.
- Puzas, J.D., Sichel, M.J. & Felter, M.E. (1992) Osteoblasts and chondrocytes are important target cells for the toxic effects of lead. *Neurotoxicology*, 13, 783-788.
- Rodríguez-Navarro, A. & García-Ruiz, J.M. (2000) Model of textural development of layered crystal aggregates. *Eur. J. Mineral.*, 12, 609-614.
- ___, Kalin, O., Nys, Y. & García-Ruiz, J.M. (2002ab). Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *Brit. Poultry Sci.*, 43, 395-403.

- ___, Gaines, K. F., Romanek, C.S. & Masson, G.R. (2002b) Mineralization of Clapper Rail eggshell from a contaminated salt marsh system. *Arch. Environ. Con. Tox.*, 43, 449-460.
- ___, Romanek, C.S., Álvarez-Lloret, P. & Gaines, K.F. (2006) Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on bone chemistry of Clapper Rail from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 4936- 4942.
- Romanek, C.S., Gaines, K.F., Brian, A.L. & Brisbin, I.L. (2000) Foraging ecology of the endangered wood stork recorded in the stable isotope signature of feathers. *Oecologia*, 125, 584-594.
- Rubio, C., Revert, C., Gutiérrez, A.J., Hardisson de la Torre, A., Lozano, G. & Martín Izquierdo, R.E. (2004). El plomo como contaminante alimentario. *Revista de Toxicología*, 21, 72-80.
- Scheuhammer, A. M. (1987) The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: A review. *Environ. Pollut.*, 46, 263-295.
- Schone, B.R., Tanabe, K., Dettman, D.L. & Sato, S. (2003) Environmental controls on shell growth rates and $\delta^{18}\text{O}$ of the shallow-marine bivalve mollusk *Phacosoma japonicum* in Japan. *Mar. Biol.*, 142, 473-485.
- Shugart, L.R. (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9, 329-340.
- Suter, G.L. (1990) Use of biomarkers in ecological risk assessment. In: J.F. McCarthy and L.R. Shugart (eds.), 419-426.
- Tortora, G.J. (1996) *Principles of Anatomy and Physiology*. New York: Addison Wesley Longman.
- Valbonesi, P., Sartor, G. & Fabbri, E. (2003) Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for bio-surveillance programmes. *Sci. Total Environ.*, 312, 79-88.
- Wejheden, C., Brunnberg, S., Hanberg, A. & Lind, P.M. (2006) Osteopontin: a rapid and sensitive response to dioxin exposure in the osteoblastic cell line UMR-106. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 341, 116-120.
- Winter, M.J, Verweij, F., Garofalo, E., Ceradini, S., McKenzie, D.J., Williams, M.A., Taylor, E. W., Butler, P.J., Van der Oost R. & Chipman J.K. (2005) Tissue levels and biomarkers of organic contaminants in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) from rivers in the West Midlands, UK. *Aquat. Toxicol.*, 73, 394-405.
- Wright, D.A. & Welbourn, P. (2002) *Environmental toxicology*. New York: Cambridge University Press.