

## Diferencias del sexo y de la edad en el contenido de metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) en pelos de lobo ibérico (*Canis lupus signatus*) del Norte de España

Hermoso de Mendoza García M<sup>\*1</sup>, Soler Rodríguez F<sup>1</sup>, García-Fernández E<sup>2</sup>, Llana L<sup>2</sup> y Pérez-López M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Toxicología, Facultad de Veterinaria (UEX). Avda. de la Universidad s/n. 10003 Cáceres.

<sup>2</sup>A.RE.NA. Asesores de Recursos Naturales S.L. Rúa Perpetuo Socorro 12, 2B. 27003 Lugo.

**Resumen:** Como consumidor situado en la cumbre de las cadenas alimenticias, el lobo ibérico (*Canis lupus signatus*) puede sufrir fenómenos de bioacumulación de diferentes contaminantes que se encuentran distribuidos en el medio ambiente. Esto permite pensar en su posible empleo para detectar y evaluar los efectos toxicológicos de xenobióticos diversos como los metales pesados en los ecosistemas terrestres, pudiendo por ello llegar a ser considerado como adecuado biomonitor del medio. Sin embargo, debido a su importancia ecológica, los métodos destructivos no son los más adecuados para dicha determinación toxicológica, de modo que las muestras no destructivas cobran gran importancia como herramienta para dicha biomonitorización. En el presente trabajo se ha determinado la influencia del sexo y de la edad en la concentración de Cd, Cu, Pb y Zn en pelo de lobos procedente del noroeste de España. Las muestras de pelo (n = 158) fueron lavadas y tras ser sometidas a una digestión por vía húmeda, las concentraciones de Cd, Cu, Pb y Zn fueron determinadas mediante Voltamperometría de Disolución Anódica. Con respecto a la variable sexo, las concentraciones más altas de todos los metales pesados estudiados se cuantificaron en el pelo de las hembras, coincidiendo con lo observado por otros autores, lo cual puede estar asociado a las diferencias fisiológicas y a los diferentes hábitos nutricionales. No obstante, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significación 0,05 en el caso del cobre, acumulándose más en las hembras que en los machos. Respecto a la variable edad, no se observó un patrón de acumulación de estos metales bien definido. Las concentraciones de Cd y Zn fueron superiores en los individuos cachorros (< 1 año) mientras que las de Cu y Pb resultaron más altas en los jóvenes (entre 1 y 2 años). En todos los casos, los niveles cuantificados pueden ser considerados indicativos de unas concentraciones relativamente bajas, sin relevancia ecotoxicológica y no constituyendo un factor medioambiental serio que pueda afectar a la supervivencia de la población considerada.

**Palabras clave:** metal pesado, mamífero, sexo, edad, pelo, métodos no destructivos.

**Abstract:** Sex and age differences in heavy metals content (Cd, Cu, Pb and Zn) in hairs of Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) from the North of Spain. As top consumers in food chains, the Iberian wolves (*Canis lupus signatus*) might experiment bioaccumulation of contaminants which are distributed in the environment, thus offering opportunities to detect and assess the toxicological effects of xenobiotics like the heavy metals on terrestrial ecosystems and to use this species as an adequate bioindicator within the environmental biomonitoring programs.

\*e-mail: marhermosodm@unex.es

Notwithstanding, destructive methods are not acceptable for those ecotoxicological purposes, thus rendering non-destructive samples as the most important tools for such biomonitoring. At the present study the sex and age influence on Cd, Cu, Pb and Zn concentration in hair of wolves from NW Spain has been determined. Hair samples (n=158) were washed and after wet digestion, Cd, Cu, Pb and Zn concentrations were measured by Anodic Stripping Voltammetry. With respect to sex, the highest concentrations of all heavy metals were quantified on female's hair, similarly to that observed by other authors, which could be associated to different physiological characteristics and nutritional habits. Nevertheless, statistically differences with a significant level of 0.05 were only observed in the case of the copper, being higher in female than in males. With respect to age, there was not a well-defined accumulation standard of the studied heavy metals. The Cd and Zn concentrations were higher in wolf cubs (< 1 year), meanwhile the Cu and Pb concentrations were higher in the young ones (between 1 and 2 years). In all cases, the quantified metal amounts could be considered as indicative of low contaminations levels, with no ecotoxicological concern, and not constituting a serious environmental factor affecting the survival of the considered populations.

**Key words:** heavy metal, mammal, sex, age, hair, non-destructive methods.

### Introducción

La contaminación ambiental es una consecuencia directa de la evolución de la sociedad y del desarrollo humano. Consecuencia de dicho desarrollo ha sido la liberación masiva de multitud de sustancias químicas de diversa índole al medio ambiente [1] sin que, en muchas ocasiones, se poseyeran conocimientos suficientes sobre su peligrosidad potencial [2]. Dentro del amplio grupo de contaminantes ambientales que existen, la familia de los metales pesados cobra gran interés por su elevada toxicidad a partir de ciertas concentraciones (a pesar de que algunos de ellos son esenciales), por su persistencia ambiental y por el hecho de ser bioacumulables, es decir, que tienden a concentrarse activamente en los seres vivos [3]. En este contexto ecotoxicológico, la cuantificación de la concentración de dichos contaminantes en los distintos compartimentos ambientales (suelo, agua o aire), no proporciona información acerca de los efectos concretos de los agentes potencialmente tóxicos sobre dichos seres vivos [4]. Por ello surge el proceso de biomonitorización, para informar acerca de las relaciones entre las condiciones ambientales y los seres vivos a lo largo de su existencia [5], ayudándose para ello de los bioindicadores,

organismos vivos que por sus características ecológicas presentan una elevada sensibilidad a los cambios ambientales causados por los agentes contaminantes y reaccionan ante ellos como si fueran estímulos específicos [6].

La aptitud como bioindicadores de la contaminación ambiental que presentan los grandes mamíferos terrestres y en concreto el lobo (*Canis lupus signatus*) consiste en que, al igual que el resto de los seres vivos asimilan contaminantes a lo largo del tiempo y de una determinada zona, pero además [7]:

- De ellos se conocen más parámetros fisiológicos y más preferencias alimenticias que de otros seres vivos.
- Las técnicas para la determinación de la edad son más fidedignas que las disponibles con otros grupos biológicos.
- El tamaño de sus cuerpos es mayor que el de otras especies, proporcionando suficiente muestra para los análisis químicos.
- En muchos casos, son animales sometidos a la caza, por lo que no es necesario sacrificarlos intencionadamente para los estudios ecotoxicológicos.
- Acumulan metales traza, un hecho que no siempre es evidente en plantas.
- Debido a sus largos ciclos vitales, los efectos de una determinada exposición pueden ser estudiados durante más tiempo.
- También los humanos son mamíferos, por lo que los resultados obtenidos son más válidos para evaluar y predecir riesgos para la salud humana.

Sin embargo, existen una serie de variables que es necesario considerar en dichos bioindicadores en lo que al contenido en metales pesados se refiere, destacando:

- El sexo, que juega un papel muy importante en la genética, fisiología, morfología y comportamiento de los organismos vivos y puede también influir en la respuesta, destino y efectos de los contaminantes en los mismos. En el caso de algunos metales pesados, las hembras parecen tener en sus tejidos unos niveles más elevados que los machos, asociado al estado reproductivo, ya que este puede implicar diferencias en los perfiles metabólicos, genéticos y hormonales de machos y hembras [8].
- La edad, factor ligado fuertemente a la cantidad de contaminante medido pues determina, especialmente frente a xenobióticos bioacumulables, la duración de la acumulación de estos en el organismo. Conviene señalar que aunque la determinación de la edad en la fauna silvestre es difícil y la mayor parte de las veces se realiza de forma imprecisa, sólo los animales del mismo grupo de edad deberían ser cotejados para obtener una comparación fiel de niveles de los diferentes metales pesados [7].

La mayoría de los programas de biomonitorización requieren un análisis de tejidos y órganos internos de la especie bioindicadora, lo que implica la destrucción de los organismos vivos. Como alternativa, la elección de las técnicas no destructivas frente a las destructivas, no sólo evita los problemas y las implicaciones éticas y ecológicas resultantes del muestreo destructivo, sino que también presentan una serie de ventajas, entre la que destacan la minimización de estrés para la población estudiada o la posibilidad de realizar

sucesivas biomonitorizaciones en las mismas poblaciones e individuos, además de la mayor facilidad de muestreo, transporte y almacenamiento de las muestras [9]. A ello hay que sumar que en diversos estudios científicos, se ha demostrado que muchos agentes tóxicos analizados mediante técnicas no destructivas poseen una correlación positiva (aunque no siempre estadísticamente significativa) con la concentración presente en los órganos internos, lo que valida la utilización de dichas técnicas de manera fiable para reflejar la contaminación ambiental. Existen estudios que concluyen que el pelo es un buen indicador no destructivo de la contaminación ambiental, lo cual hace a este tejido adecuado para reflejar la exposición a metales pesados. La idoneidad que el pelo presenta se debe a que está continuamente en contacto con el torrente sanguíneo en el folículo piloso y va incorporando los metales presentes en la sangre mientras va creciendo [10]. Además hay que señalar que la deposición en el pelo de partículas metálicas presentes en el medio ambiente no interfiere de modo alguno en los análisis, pues las técnicas previas de limpieza de las muestras minimizan cualquier contaminación superficial [11]. Sin embargo, aunque rutinariamente se ha utilizado en estudios humanos, apenas se ha empleado en mamíferos terrestres y existe, por tanto, escasa bibliografía al respecto.

En definitiva, el hecho de emplear pelo para determinar la concentración de metales en ciertos animales constituye una línea de trabajo puntera que está aún por desarrollarse en profundidad. Con estas premisas, el objetivo del presente trabajo de investigación ha sido determinar los niveles de los metales pesados cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn) en pelo de lobo, a fin de que estas muestras puedan ser empleadas con utilidad para valorar el estado ecotoxicológico en que se encuentra el ecosistema en cuestión. En base a los resultados obtenidos se ha analizado la existencia de patrones de acumulación de los distintos metales en función del sexo y la edad de la especie estudiada.

## Material y Métodos

La cuantificación de la concentración de los elementos inorgánicos analizados (Cd, Cu, Pb y Zn) se realizó en los pelos de ejemplares de lobo ibérico (*Canis lupus signatus*) recogidos entre los años 2001 y 2008, de diferente sexo y edad, pertenecientes a distintos puntos geográficos del norte de España. En la tabla 1 adjunta se detallan pormenorizadamente los ejemplares analizados en el presente estudio, indicando el número de ejemplares pertenecientes a cada una de las variables estudiadas. Las muestras fueron tomadas aprovechando los controles poblacionales que sistemáticamente son

**Tabla 1.** Tabla clasificatoria del número de muestras empleadas en el presente estudio, en función de las variables consideradas: sexo y edad.

<b>Sexo</b>	<b>Machos</b>	<b>87</b>
	<b>Hembras</b>	<b>71</b>
<b>Edad</b>	<b>Adultos (&gt;2 años)</b>	<b>64</b>
	<b>Jóvenes (1-2 años)</b>	<b>46</b>
	<b>Cachorros (&lt; 1 año)</b>	<b>20</b>
	<b>Desconocida</b>	<b>28</b>

realizados por parte de las autoridades competentes o bien de animales que fueron hallados muertos.

Para su procesado, las muestras de pelo individualizadas por ejemplar y adecuadamente identificadas fueron lavadas, eliminando la suciedad más evidente bajo el grifo y posteriormente realizando cuatro enjuagues sucesivos de 10 minutos cada uno con acetona (de grado analítico, ACS) y agua milli-Q para eliminar la posible contaminación superficial [11]. A continuación, las muestras fueron desecadas en una estufa a 60°C durante 24 horas, pesándose aproximadamente 100 mg. Esta alícuota se sometió a una digestión vía húmeda mediante la adición de 6 ml de una mezcla ácida (nitrato para análisis traza al 69%, perclórico ultra puro al 70% y sulfúrico para análisis traza al 94%, en proporción 8:8:1) [12]. La digestión se realizó en tubos de vidrio borosilicatado previamente lavados con HNO<sub>3</sub> al 10%, empleando un digestor automatizado, aplicándose un programa de temperaturas situado entre la temperatura ambiente y 370°C durante 5 horas y media. Una vez completada la digestión, el residuo resultante fue resuspendido en 400 µl de HCl de grado analítico al 37% completando con agua milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 40 ml. Para el análisis cuantitativo de los metales pesados en la disolución final se optó por la Voltamperometría de redisolución anódica con electrodo de mercurio, añadiendo 1 ml de tampón acetato para la correcta cuantificación de Zn y Cu. Los límites de detección extrapolados a las muestras fueron 0,02 µg/l (Cd), 1,5 µg/l (Cu), 0,1 µg/l (Pb) y 20 µg/l (Zn). Las concentraciones finales en las muestra de pelo se expresaron referidas a peso seco. El control de calidad del método se realizó mediante el análisis de una muestra certificada de músculo bovino liofilizado de BCR (referencia nº 184).

El análisis estadístico de los resultados se realizó por medio del programa SPSS 15.0. Se obtuvieron los principales estadísticos (media, desviación estándar, valores mínimos y máximos y porcentaje del número de muestras que se encuentran por debajo del límite de detección) tanto a nivel global como en función de cada variable. Debido a la ausencia de una distribución normal en todos los resultados y a la desigualdad de los tamaños muestrales en función de cada variable, se optó por realizar pruebas no paramétricas para el análisis de las varianzas. En concreto, se realizaron las pruebas de U de Mann-Whitney para la variable "sexo" y H de Kruskal-Wallis para la variable "edad". Debido a la observación de diferencias significativas entre grupos para algunas de las variables, para determinar entre cuáles de estos grupos existían tales diferencias, se realizó el test post-hoc de comparaciones múltiples de libre distribución [13]. Por último, se llevó a cabo un estudio de correlaciones entre las concentraciones de los metales estudiados para cada grupo y variable, para ello se determinó la Rho de Spearman para comprobar si el grado de asociación de cada binomio de variables independientes resultaba estadísticamente significativo. A todas aquellas muestras cuyas concentraciones eran inferiores al límite de detección se les asignó un valor a efectos estadísticos correspondiente a la mitad del límite de detección, para de esta forma minimizar el error nominal de tipo I [14].

## Resultados y Discusión

En la tabla 2 se muestran los principales estadísticos descriptivos (media, desviación estándar y valores máximos y mínimos) obtenidos en el presente estudio al determinar la concentración de cada uno de los metales analizados (cadmio, cobre, plomo y zinc) en las muestras de pelo de los 158 lobos, sin diferenciar en función de sexos y edades, todos ellos expresados en µg/g y referidos a peso

**Tabla 2.** Principales estadísticos descriptivos. Los valores están expresados en µg/g (referidos a peso seco). N: número de muestras analizadas, D.S.: desviación estándar; L.D.: límite de detección.

	N	Media	D.S.	Mínimo	Máximo	N<L.D. (%)
<b>Cd</b>	158	0,037	0,070	<L.D.	0,470	106 (67,1 %)
<b>Cu</b>		10,030	3,868	0,897	23,322	0
<b>Pb</b>		1,228	2,071	<L.D.	22,839	10 (6,4 %)
<b>Zn</b>		205,242	60,062	<L.D.	412,102	4 (2,5 %)

seco. Además, también se incluye, por el interés estadístico que posee, el número de muestras de pelo analizado (expresado también en tanto por ciento del total de las muestras disponibles) cuya concentración ha resultado inferior al límite de detección instrumental.

Se observa que las concentraciones más elevadas corresponden al zinc y el cobre, ambos elementos esenciales, mientras que el plomo y el cadmio (este último con el mayor porcentaje de muestras cuyos valores son inferiores al límite de detección), ambos sin funciones fisiológicas, presentan los valores más bajos, siendo indicativos de la contaminación presente en el medio.

De forma más detallada, se representan gráficamente las concentraciones de Cd y Cu (gráfica 1) y Pb y Zn (gráfica 2), en las muestras de pelo de lobo ibérico, expresadas en µg/g referidas a peso seco y en función del sexo (M: macho, H: hembra) y de la edad (C: cachorro, <1 año de edad; J: joven, 1 a 2 años de edad, A: adulto, >2 años de edad), incluyendo mediana, valores extremos y valores atípicos.

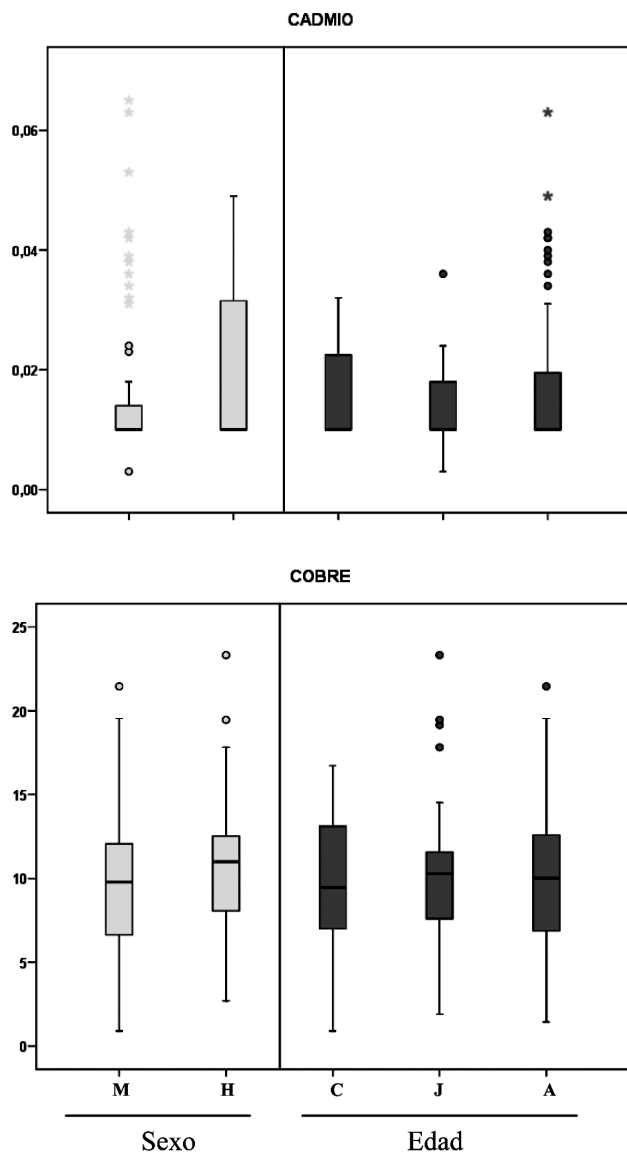
### Sexo

Con respecto a la variable sexo, se percibe en todos los casos que las medianas suelen presentarse en unos niveles ligeramente más altos en las hembras que en los machos, no ocurriendo así con el número de valores extremos y atípicos, al presentarse con mayor frecuencia en estos últimos.

Respecto a los valores medios obtenidos en el presente estudio, se ha observado en todos los casos que si bien no existe un patrón de acumulación de los metales pesados estudiados (Cd, Cu, Pb y Zn) en pelo de lobo en función del sexo, sí existe una tendencia mayor de las hembras a acumularlos. No obstante, hay diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significación 0,05 (marcada con un asterisco \*), como se muestra en la tabla 3 del estudio de varianzas realizado mediante la prueba de U de Mann-Whitney en función del sexo, únicamente en el caso del cobre, acumulándose más en las hembras que en los machos.

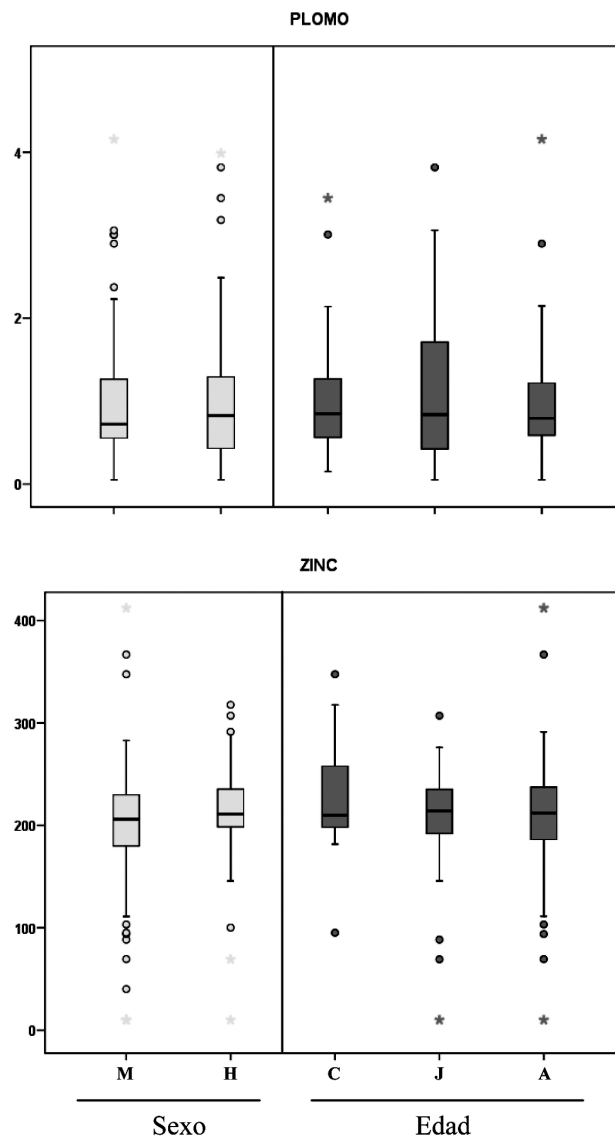
### - Cadmio

La influencia del sexo en los niveles de cadmio ha sido demostrada en varias especies en las que las hembras presentan concentraciones más elevadas que los machos, posiblemente debido a que las hembras consumen más comida por kilogramo de peso que los machos, aunque estas diferencias no suelen ser significativas desde el punto de vista estadístico [7]. Uno de los primeros estudios que constataba este hecho se realizó en pelo de caballo (*Equus caballus*) [15]. Otro estudio posterior realizado también en pelo de caballo y tendente a



**Gráfico 1.** Concentraciones de Cd y Cu ( $\mu\text{g/g}$ ) en muestras de pelo de lobo ibérico, referidas a peso seco y en función del sexo y de la edad. Las cajas indican los percentiles al 10, 25, 50 (mediana), 75 y 90%, los valores extremos (\*) y los valores atípicos (O).

determinar la influencia del sexo, mostraba unas concentraciones medias de cadmio de  $0,15 \pm 0,13 \mu\text{g/g}$  en el caso de los machos y  $0,09 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$  en las yeguas [16]. En el presente estudio, los valores medios cuantificados en los machos se sitúan en  $0,034 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$  y en  $0,041 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$ , las hembras. Se observa que los valores de cadmio obtenidos en machos son mayores a los obtenidos en hembras, pudiendo deberse, además de a sus diferentes longevidades, al hecho de que los niveles de acumulación de cadmio en el músculo son, en general, muy bajos y este tejido constituye una parte fundamental de la dieta de un carnívoro [7]. Por el contrario, los herbívoros estrictos están expuestos a ciertos metales pesados (tal es el caso del cadmio) a través de la ingestión de plantas (pues este metal se deposita en el suelo), pudiendo constituir esta una vía de exposición más importante que la carnívora [17].



**Gráfico 2.** Concentraciones de Pb y Zn ( $\mu\text{g/g}$ ) en muestras de pelo de lobo ibérico, referidas a peso seco y en función del sexo y de la edad. Las cajas indican los percentiles al 10, 25, 50 (mediana), 75 y 90%, los valores extremos (\*) y los valores atípicos (O).

**- Cobre**

En el caso del cobre, también se observa una tendencia a una mayor concentración en las hembras ( $10,78 \pm 3,55 \mu\text{g/g}$ ) frente a los machos ( $9,42 \pm 4,03 \mu\text{g/g}$ ), tal y como ocurre en otros estudios. Tal es el caso de un trabajo realizado en Japón en pelo de perros, donde se cuantificaban  $30,5 \pm 10,3 \mu\text{g/g}$  y  $36,1 \pm 14,5 \mu\text{g/g}$  de cobre en machos y en hembras respectivamente [18], aunque sin significación estadística asociada al factor sexo. Sin embargo (y a pesar de no ser totalmente comparable), un estudio de la concentración del cobre en pelo de alce americano (*Alces alces*) cuantificaba unos valores de  $3,94 \pm 0,42 \mu\text{g/g}$  en los machos y  $2,77 \pm 0,72 \mu\text{g/g}$  en las hembras [19]. Años más tarde, el estudio antes referido realizado en pelo de caballo no obtuvo apenas diferencias entre ambos sexos, hallando concentraciones de cobre de  $5,0 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$  para los machos y  $5,0 \pm 1,7$

µg/g, en las yeguas [16].

Como se mencionó anteriormente, el cobre es el único elemento que presenta unos valores cuantificados con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ), entre machos y hembras (tabla 3), presentando mayor concentración estas últimas. No existe ningún otro estudio que evidencie tales diferencias entre machos y hembras, si bien no todos los animales incorporan este metal en sus respectivas dietas de la misma manera [20].

*- Plomo*

Diversos autores concluyen que no existe influencia significativa del sexo en la acumulación de este metal [7, 21]. No obstante, el estudio antes referido realizado en pelo de caballo cuantificaba  $0,76 \pm 0,28$  µg/g para los caballos y  $1,24 \pm 1,28$  µg/g en el caso de las yeguas [16]. Por su parte, el estudio en pelo de perro también referenciado con anterioridad, observaba que las concentraciones de plomo eran  $1,77 \pm 1,05$  µg/g en machos y  $2,06 \pm 1,14$  µg/g en hembras [18]. En el presente estudio ocurrió lo mismo: los valores cuantificados en los machos ( $1,069 \pm 0,99$  µg/g) se presentaban en concentraciones más bajas que las hembras ( $1,424 \pm 2,88$  µg/g). Se observa que para todos los casos, los valores cuantificados en las hembras son superiores a los cuantificados en machos, coincidiendo así con la bibliografía consultada.

*- Zinc*

Es uno de los elementos esenciales más abundantes en el organismo [23], de ahí los elevados niveles cuantificados, cuyos valores medios son  $198,92 \pm 68,05$  µg/g en el caso de los machos y  $212,99 \pm 47,87$  µg/g en el de las hembras. Estudios similares efectuados en perros cuantificaban  $205,4 \pm 39,7$  µg/g de zinc en pelo perteneciente a los machos y  $210,2 \pm 44,6$  µg/g en hembras, valores muy semejantes a los referidos en el presente trabajo [18]. El estudio de Asano y colaboradores [16] coincidía con estas observaciones, encontrando unas concentraciones de zinc en yeguas ( $92 \pm 25$  µg/g) superiores a las halladas en los caballos ( $88 \pm 31$  µg/g).

El estudio estadístico de correlaciones se ha determinado mediante el coeficiente de correlación de Spearman para ambos sexos, a fin de conocer si los metales estudiados presentan alguna relación estadísticamente significativa (entre sí) en cualquiera de los sexos estudiados (machos o hembras). Se concluyó que no existen dichas correlaciones entre ninguno de los pares de metales considerados, con ningún nivel de significación estadística, ni en el caso de los machos, ni en el caso de las hembras.

**Edad**

Se hace referencia a las gráficas 1 y 2, que representan las concentraciones de Cd y Cu, y Pb y Zn (µg/g) en muestras de pelo de lobo ibérico, referidas a peso seco y en función del sexo y de la edad, incluyendo mediana, valores extremos y valores atípicos. No se observan diferencias notables para los distintos metales entre las medianas que presentan los tres grupos de edad considerados, aunque los individuos adultos suelen presentar unos valores ligeramente inferiores. Destaca también que tanto los valores atípicos como los extremos se concentran en los individuos jóvenes y adultos.

En el análisis de los valores medios obtenidos se observa que no existen diferencias significativas entre la concentración de los metales estudiados (Cd, Cu, Pb y Zn) para los grupos de edad considerados. No existe un patrón de acumulación de los metales pesados estudiados (Cd, Cu, Pb y Zn) en pelo de lobo en función de la

edad, aunque los individuos jóvenes y cachorros suelen presentar niveles ligeramente más elevados que los adultos. No existen, no obstante, diferencias estadísticamente significativas, como se muestra en la tabla 3 referente al estudio de varianzas realizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis (por tratarse esta vez de 3 ó más grupos cuyas comparaciones se van a establecer entre sí).

**Tabla 3.** A) Prueba de Mann-Whitney en función del sexo y B) Prueba de Kruskal-Wallis en función de la edad de los individuos estudiados.

A)	Cd	Cu	Pb	Zn
<b>U de Mann-Whitney</b>	2816.50	2456.50	3006.50	258.70
<b>Sig asintót.</b>	0,236	0,027*	0,774	0,080

\* Diferencias estadísticamente significativas para  $p < 0,05$

B)	Cd	Cu	Pb	Zn
<b>H de Kruskal-Wallis</b>	0,163	0,053	0,125	0,032
<b>Grados de libertad</b>	2	2	2	2
<b>Sig asintót.</b>	0,922	0,974	0,939	0,839

La edad del animal está fuertemente ligada a la cantidad de contaminantes que este concentra, más aún si de xenobióticos bioacumulables se trata, ya que el folículo piloso está en contacto con el torrente sanguíneo y por tanto, va incorporando los metales presentes en la sangre a medida que el individuo y el pelo van creciendo. Por este motivo cabía esperar una concentración más alta de los metales pesados en aquellos individuos de mayor edad, aunque los resultados obtenidos no muestran este efecto. No se ha observado un modelo de distribución uniforme, pues mientras que los jóvenes parecen concentrar en mayor cantidad el cobre y el plomo, son los cachorros lo que presentan las concentraciones más altas de cadmio y zinc. Es necesario señalar que el proceso fisiológico de la muda del pelo pudiera tener cierta influencia en los resultados obtenidos. Por una parte, porque existen estudios en lo que se ha observado que los niveles encontrados en este tipo de muestras reflejan las concentraciones metálicas en el momento en que se formó el pelo, sin tener por qué coincidir con las concentraciones existentes en el momento de recolección del mismo [24] y dado que el lobo pierde su pelaje de invierno a partir de mayo, el momento en que se tomaron las muestras puede afectar a los resultados obtenidos. Por otra parte porque el pelaje de los individuos jóvenes suele tener una coloración más oscura que el de los adultos y la diferencia de color puede afectar a los resultados obtenidos, como se observó en un estudio de la concentración de mercurio en jabalí donde el pelo rojo poseía una concentración superior al negro [25].

*- Cadmio*

La bibliografía consultada afirma que este es el más típico de los metales pesados cuyo contenido se incrementa con la edad: existen numerosos estudios que demuestran la existencia de una relación positiva entre la edad y la acumulación del cadmio, sobre todo, en cuanto a órganos internos se refiere, en riñones [7] y en hígado [26-28]. Los valores medios cuantificados en el presente estudio son  $0,022 \pm 0,03$  µg/g en el caso de los adultos,  $0,041 \pm 0,09$  µg/g en jóvenes y  $0,049 \pm 0,09$  en cachorros, mostrando estos últimos las concentraciones más elevadas, aunque muy similares a las encontradas en los jóvenes y mostrando ambos (cachorros y jóvenes)

la misma desviación estándar. Los valores hallados en un estudio realizado en pelo de perros clasificados en cuatro grupos de edad diferentes (menores de 1 año, 2–4 años, 5–7 años y mayores de 7) eran inferiores tanto en los individuos cachorros (0,39±0,15 µg/g), como en los adultos (0,22±0,11 µg/g), mientras que los valores más altos se cuantificaban en las edades intermedias (0,44±0,29 µg/g y 0,56±0,26 µg/g en los individuos de 2–4 años y 5–7, respectivamente), todos ellos sin grado de significación alguno [18].

El estudio realizado en pelo de caballos jóvenes (2,3 4 y 5 años) obtenía unos valores de 0,04±0,00 µg/g (2 años), 0,11±0,14 µg/g (3 años), 0,11±0,14 µg/g (4 años) y 0,20±0,06 µg/g (5 años respectivamente) [16], lo que mostraría una ligera tendencia a concentrarse cada vez más en función de la edad, al contrario de lo que parece ocurrir en el presente estudio. Hay que recordar, como se mencionó anteriormente, que al cadmio suele presentarse en valores muy bajos en los grandes carnívoros porque no se acumula en el músculo, tan abundante en la dieta de estos [7].

#### - Cobre

Los valores de cobre referidos a peso seco cuantificados en el presente estudio mostraron unas concentraciones medias que oscilaron entre 9,74±4,23 µg/g los cachorros, 9,96±3,94 µg/g los adultos y 10,00±4,32 µg/g los jóvenes. Con respecto a este metal, la investigación llevada a cabo en pelo de perros clasificados en los cuatro grupos de edad antes referenciados cuantificaba 24,1±7,6 µg/g en cachorros, 33,0±1,9 µg/g en los individuos entre 2 y 4 años, 30,0±9,3 µg/g en los individuos entre 5 y 7 años y 38,8±18,4 µg/g en los individuos mayores de 7 años [18]. La tendencia de acumulación es similar a la observada en cachorros de los lobos, presentando los individuos jóvenes los valores más bajos. Sin embargo, si en los perros las concentraciones cuantificadas de cobre se incrementan con la edad, no ocurre igual en el caso de los lobos, donde son precisamente los individuos de edad intermedia los que poseen las concentraciones más elevadas. Además en general los valores obtenidos en el análisis cuantitativo de este metal en los perros son muy inferiores a los aquí obtenidos. El estudio realizado en pelo de caballos jóvenes cuantificaba unos valores de 4,7±0,8, 4,4±0,4, 4,3±1,8 y 5,9±1,0 µg/g (2, 3, 4 y 5 años de edad respectivamente) [16], observándose de nuevo una tendencia de este metal a concentrarse cada vez más en función de la edad. Un estudio realizado en pelo de camellos (*Camelus bactrianus*) adultos de China mostraba valores de 4,8±0,8 µg/g [28], inferiores a los obtenidos en nuestro estudio. Observando las diferencias existentes entre los valores cuantificados en perros y lobos y comparando con los hallados en caballos y camellos, se vuelve a poner de manifiesto la influencia de la dieta en la concentración de contaminantes reflejada en numerosa bibliografía [17, 29].

#### - Plomo

Tanto los valores medios más elevados, como la desviación estándar más alta de este metal en pelo de lobo, se cuantificaron en los individuos jóvenes (1,72±3,52 µg/g), frente a los valores más bajos correspondientes a los individuos adultos (0,98±0,70 µg/g) o los que presentaban los cachorros (1,08±0,89 µg/g).

El estudio realizado en perros citado anteriormente cuantificaba 0,81±0,25 µg/g en cachorros, 1,91±0,74 µg/g en los individuos entre 2 y 4 años, 2,20±1,02 µg/g en los individuos entre 5 y 7 años y 2,0±1,2 µg/g en los individuos mayores de 7 años [18]. La tendencia del plomo a concentrarse en función de la edad en los perros que este estudio muestra, no se repite en el caso de los lobos, donde, una vez más, es en los individuos jóvenes donde se han cuantificado los

niveles más altos de este metal (frente a los cachorros y los adultos). En pelo de caballo se obtuvieron concentraciones de 0,71±0,02 µg/g (2 años), 1,13±1,31 µg/g (3 años), 0,92±0,36 µg/g (4 años) y 0,77±0,29 µg/g (5 años respectivamente) [16], observándose una tendencia a concentrarse cada vez más en función de la edad. Volviendo al estudio realizado en pelo de perros, este concluía la no existencia de un patrón de acumulación del plomo en función de la edad [18], como también podría afirmarse para los lobos en función de los resultados obtenidos. Coinciden estos resultados con otros autores que afirman que la edad no parece ser un factor significativo en la acumulación del mismo en los tejidos blandos, pero sí lo es en los tejidos calcificados del esqueleto, debido a la prolongada vida media que el plomo posee en los huesos [7].

#### - Zinc

Los valores cuantificados de este metal vuelven a ser los más altos, al tratarse como se ha dicho de un elemento esencial, con valores medios de 223,85±54,48 µg/g en cachorros, 207,96±52,02 µg/g en jóvenes y 210,69±59,95 µg/g en adultos. Teniendo en consideración los valores cuantificados para este metal en pelo de perro (145,8±10,7 µg/g en los individuos menores de un año, 216,1±41,2 µg/g en los individuos entre 2 y 4 años, 223,2±41,0 µg/g en los individuos entre 5 y 7 años y 227,0±32,2 µg/g en los individuos mayores de 7 años) [18], pudiera afirmarse que este metal presenta un patrón de acumulación definido en función de la edad, aumentando con el tiempo. No ocurre lo mismo en el presente trabajo, donde los valores más altos cuantificados pertenecen a los individuos que son aún cachorros, siguiéndole los adultos y por último, los de edades intermedias. Aún así, y a grandes rasgos, los valores cuantificados en todos los perros mayores de un año, son similares a los cuantificados en lobos, si bien la concentración analizada en los perros menores de esta edad es mucho menor. El estudio realizado en pelo de caballos estableció unos valores de 86,0±40,7 µg/g (2 años), 81,6±7,2 µg/g (3 años), 77,5±32,5 µg/g (4 años) y 101,7±14,9 µg/g (5 años respectivamente) [16]. El trabajo de Zongping [28] realizado en pelo de camellos adultos de China obtuvo valores de 146,9±18,2 µg/g. Se trata en todo momento de resultados muy similares a los obtenidos en nuestra investigación, pues los valores más altos se presentan en los ejemplares adultos y jóvenes, siendo estos últimos los más elevados. No hay que olvidar que este metal es considerado esencial y por tanto, los niveles son regulados fisiológicamente por los organismos.

Para finalizar se ha efectuado el estudio de correlaciones para determinar si los pares de metales estudiados presentan alguna relación estadísticamente significativa en cualquiera de los grupos de edad considerados (cachorros, jóvenes y adultos). Se ha determinado el coeficiente de correlación de Spearman, cuyos resultados se exponen en la tabla 4, donde se observa que tan sólo existen correlaciones entre el cobre y el cadmio en los cachorros (menores de 1 año) con un grado de significación 0,05 de signo negativo, lo que sugiere que a medida que se incrementa la concentración de cobre, disminuye el cadmio y a la inversa. Esta relación puede ser debida a las interacciones metabólicas y competiciones que existen entre ambos metales por los sitios activos de las enzimas, ya referida por Davis y Mertz [20].

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se ha establecido un primer acercamiento al contenido de metales pesados en pelos de lobos de sexos y edades diferentes y se ha evaluado cómo estas variables influyen en dicho contenido. Teniendo en consideración otros trabajos similares desarrollados, el pelo de lobo pudiera no ser considerado como un tejido idóneo para el desarrollo

de programas de biomonitorización de la contaminación ambiental, si bien, dada la escasez de trabajos centrados en esta especie, serían interesantes futuros estudios que permitieran asociar dichos resultados a los niveles de contaminantes presentes en otros tejidos internos. Constituye una importante primera aproximación a la cuantificación metálica en estos organismos, la concreción de las variables a considerar y de los ecosistemas que representan, para que futuros estudios puedan profundizar más en el conocimiento de la realidad ecotoxicológica de esta especie animal y sus ecosistemas.

## Bibliografía

1. Stallwitz E, Häder DP (1994) Effects of heavy metals on motility and gravitactic orientation of flagellate (*Euglena gracilis*). *Eur J Protistol* 30(1):18–24.
2. Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (1998) Utilisation de Biomarqueurs pour la Surveillance de la Qualité de l'Environnement. Ed. Lavoisier, Tec&Doc, Paris. Francia.
3. Martín A, Santamaría JM (2004) Diccionario terminológico de contaminación ambiental. Ed. Ediciones Universidad de Navarra S.A. EUNSA, Navarra. España.
4. Henderson RF, Bechtold WE, Bond JA, Sun JD (1989) The use of biological markers in toxicology. *Crit Rev Toxicol* 20:65–82.
5. Moreno MD (2003) Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgo para la Salud Humana. Ed. McGraw - Hill, Madrid. España.
6. Spanh SA, Sherry TW (1999) Cadmium and lead exposure associated with reduced growth rates, poorer fledging success of little blue heron chicks (*Egretta caerulea*) in south Louisiana wetlands. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:377–384.
7. Tataruch F, Kierdorf H (2003) Mammals as bioindicators. En: *Bioindicators and Biomonitoring: principles, concepts and applications*. Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G. (eds.). Ed. Elsevier, Amsterdam. Holanda, 737–772.
8. Burger J, Fossi C, McClellan-Green P, Orlando EF (2007) Methodologies, bioindicators and biomarkers for assessing sex-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environ Res* 104:135–152.
9. Fossi MC, Leonzio C, Peakall DB (1994) The use of non-destructive biomarkers in the hazard assessment of vertebrate populations. En: *Non-destructive Biomarkers in Vertebrates*. Fossi M.C., Leonzio C. (eds.). Ed. CRC Press, Boca Raton. EE.UU.: 3–34.
10. Burger J, Márquez M, Goechfeld M (1994) Heavy metals in the hair of opossum from Palo Verde, Costa Rica. *Arch Environ Contam Toxicol* 27(2):154–161.
11. International Atomic Energy Agency (I.A.E.A.) (1978) Activation analysis of hair as an indicator of contamination of man by environmental trace element pollutants. IAEA/RL/50, Viena. Austria.
12. Patra RC, Swarup D, Naresh R, Kumar P, Nandi D, Shekhar P, Roy S, Ali SL (2007) Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in different industrial areas. *Ecotoxicol Environ Saf* 66:127–131.
13. Shayne C (1999) *Statistics and experimental design for toxicologists*. Ed. CRC Press LLC, Boca Raton, EE.UU.
14. Clarke (1998) Evaluation of censored data methods to allow statistical comparisons among very small samples with bellow detection limits observations. *Environ Sci Technol* 32:177–183.
15. Anke M, Kosla T, Groppel B (1989) The cadmium status in horses from central Europe depending on breed, sex, age and living area. *Arch For Tierernahrung* 39:657–683.
16. Asano R, Suzuki K, Otsuka T, Otsuka M, Sakurai H (2002) Concentration of toxic metals and essential minerals in the mane hair of healthy racing horses and their relation to age. *J Vet Med Sci* 64(7):607–610.
17. Gamberg M, Palmer M, Roach P (2005) Temporal and geographic trends in trace element concentrations in moose from Yukon, Canada. *Sci Total Environ* 351/352:530–538.
18. Hayashi M, Okada I, Tate H, Miura Y, Ohhira S, Yamada Y (1981) Distribution of environmental pollutants in pet animals: heavy metals in hair of house-dogs. *Bull Environm Contam Toxicol* 26:60–64.
19. O'Hara TM, Carroll G, Barboza G, Mueller P, Blake K, Woshner J (2001) Mineral and heavy metal status as related to a mortality event and poor recruitment in a moose population in Alaska. *J Wildl Di.* 37 509–522.
20. Davis GK, Mertz W (1987) Copper. En: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. W. Mertz (eds.). Ed. Academic Press, Orlando. EE.UU.
21. Medvedev N (1999) Levels of heavy metals in Karelian wildlife, 1989–91. *Environ Monit Assess* 56:177–193.
22. Repetto M (1995) *Toxicología avanzada*. Ed. Díaz Santos, Madrid. España.
23. Nostrom RJ, Sweinsberg RE, Collins BT (1986) Heavy metals and essential elements in liver of the polar bear (*Ursus maritimus*) in the Canadian Arctic. *Sci Total Environ* 48:195–212.
24. Renzoni A, Norstrom RJ (1990) Mercury in the hairs of polar bears (*Ursus maritimus*). *Polar Rec* 26:326.
25. Sobanska MA (2005) Wild boar hair (*Sus scrofa*) as a non-invasive indicator of mercury pollution. *Sci Total Environ* 339:81–88.
26. Braune BM, Norstrom RJ, Wong MP, Collins BT, Lee J (1991) Geographical distribution of metals in livers of polar bears from the Northwest Territories, Canada. *Sci Total Environ* 100:283–299.
27. Dietz R, Riget F, Born EW (2000) Geographical differences of zinc, cadmium, mercury and selenium in polar bears (*Ursus maritimus*) from Greenland. *Sci Total Environ* 245:25–47.
28. Zongping L (2003) Studies on the haematology and trace elements status of adult Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) in China. *Vet Res Commun* 27:397–405.
29. Funke W, Feige GB, Jahnke S, Reidl K (1993) *Bioindikatoren*. En: *Handbuch zur Ökologie Analytica*. Ed. Kuttler W., Berlín. Alemania: 60–68.