

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MINERALOGIA Y PETROLOGIA



ALTERACIÓN DE LA
MINERALIZACIÓN DEL HUESO
DEBIDA A LA EXPOSICIÓN A
CONTAMINANTES
(ORGANOCOLORADOS Y METALES PESADOS)

TESIS DOCTORAL

PEDRO ALVAREZ LLORET
2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Pedro Álvarez Lloret
D.L.: GR. 2222-2008
ISBN: 978-84-691-6779-3



**Departamento de Mineralogía y Petrología
Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**ALTERACIÓN DE LA MINERALIZACIÓN DEL HUESO
DEBIDA A LA EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES
ORGANOCOLORADOS Y METALES PESADOS**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el Licenciado en Ciencias Ambientales D. Pedro Álvarez Lloret para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, 12 de Septiembre de 2008

VºBº del Director

Fdo. Pedro Alvarez Lloret

Fdo. Alejandro Rodríguez Navarro



*Preludio nº 2 BWV 847 en Do menor
"El Clave Bien Temperado"
Johann Sebastian Bach*

Está permitida la reproducción total o parcial de esta tesis, siempre que se mencione a su autor y que no se obtenga con ello beneficio económico alguno.

Tesis revisada y corregida por:

Giuseppe Falini
Alma Mater Studiorum
Università di Bologna, Italy.

Jorge Machado
Instituto de Ciencias Biomedicas Abel Salazar
Universidade do Porto, Portugal.

AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN / ABSTRACT.....	7/11
LISTA DE MANUSCRITOS / LIST OF MANUSCRIPTS.....	15/17
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS.....	19
1. INTRODUCCIÓN.....	21
1.1. Biomineralización.....	21
1.1.1. Aspectos generales.....	21
1.1.2. Ejemplos de biomineralización.....	26
1.1.3. El hueso como tejido mineralizado.....	29
1.2. Toxicología.....	36
1.2.1. Toxicología general.....	36
1.2.2. Indicadores biológicos de toxicidad.....	41
1.2.3. Toxicidad asociada a tejidos mineralizados.....	45
1.2.4. Perfiles toxicológicos de los contaminantes estudiados.....	49
- <i>Plomo</i>	49
- <i>Mercurio</i>	51
- <i>Policlorobifenilo (PCB)</i>	54
- <i>2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)</i>	57
1.3. Justificación y objetivos.....	59
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
2.1 Material.....	63
2.1.1 Muestras empleadas.....	63
2.1.2 Preparación de las muestras óseas.....	65
2.2 Técnica analíticas utilizadas.....	66
2.2.1 Espectrometría de Absorción Atómica.....	66
2.2.2 Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo.....	67
2.2.3 Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma de Acoplamiento Inductivo.....	68

2.2.4 Espectrometría de Masas de Razones Isotópicas.....	69
2.2.5 Microscopia Electrónica de Transmisión.....	70
2.2.6 Espectroscopia Infrarroja.....	72
<i>Espectrómetros con transformada de Fourier.....</i>	<i>74</i>
<i>Preparación de las muestras para el análisis FTIR.....</i>	<i>77</i>
<i>Equipos FTIR empleados.....</i>	<i>78</i>
<i>Análisis espectral.....</i>	<i>78</i>
2.3 Validación del método de deconvolución	
del espectro de FTIR.....	85
2.3.1 Difracción de Rayos X.....	85
2.3.2 Termogravimetría.....	89
2.4 Análisis estadísticos y paquetes informáticos empleados.....	92
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
4. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	103/107
5. BIBLIOGRAFÍA.....	111
6. MANUSCRIPTS.....	137

Agradecimientos

Me gustaría aprovechar estas líneas para expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido en la realización de esta memoria de tesis doctoral.

En primer lugar quiero agradecer y reconocer a Alejandro Rodríguez Navarro su inestimable ayuda, confianza, denuedo, ánimo y apoyo durante estos años de trabajo. Alejandro, mi más sincera estima y gratitud.

Agradezco al Departamento de Mineralogía y Petrología de la Universidad de Granada por acoger física y personalmente mi trabajo en estos años de doctorado, especialmente, a su director, Dr. Miguel Ortega Huertas, por el interés mostrado en la consecución de este trabajo. De igual modo, agradezco la ayuda del personal del CIC de la Universidad de Granada y el Savannah River Ecology Laboratory de la Universidad de Georgia que han colaborado en la preparación y análisis de las muestras y al Departamento de Química Inorgánica por permitirme el acceso a sus laboratorios.

I would like to thank to Dr. Monica Lind for her hospitality and affect during my stay at the Karolinska Instiutet, Sweden. Thanks for making me feel at home in Stockholm. *Tack!*.

I would also like to thank to Dr. Christian Riekkel (ESRF, Francia) and Dr. Maxwell Hincke (University of Ottawa, Canada) for their help during my stages at theirs labs and research groups.

Gracias a Giuseppe Falini (Università di Bologna, Italia) y Jorge Machado (Universidade do Porto, Portugal) por la revisión y corrección del manuscrito de la tesis.

Buena parte del trabajo descrito en los manuscritos no hubiera sido posible sin la ayuda y material proporcionado por Laura Gangoso, José Antonio Donázar (EBSO) y Rafael Mateo (IREC). Gracias a todos ellos por su colaboración y dedicación.

Gracias a Ana Labrador por prestarme su valiosa ayuda en *BM16* durante mi estancia en Grenoble. A Delphine, Maya, Fernando, Alejandro, Roberto, Lorena, Roberta, Leticia, José... - y todos mis compañeros del sincrotrón- por regalarme tres meses de *Chartreuse, Saint-Félicien, Moutarde de Dijon, morbier, viande à point...*

Gracias a todos mis compañeros del Departamento de Mineralogía y Petrología: a David, por su ingenio musical, a Inés, por ayudar a su amigo "*Peter Sunday*", a Carol, por compartir su despacho vecino con bromas, ánimo y trabajo, a Javi, a Ana, a Claudio, a Vanesa, a Iñaki, a Giuseppe... la lista resultaría infinita entre los que llegaron, se fueron y permanecen... pero, sobre todo, a Encarni, mi "*prima científica*", ha sido una suerte compartir despacho, laboratorio, congresos, viajes y amistad contigo en estos años de trabajo. Gracias a África, no te puedes imaginar el valor de tu ánimo y afecto desde el momento en que *irrupiste* por primera vez en mi despacho, espero compartir además años de trabajo contigo. Gracias también por su amistad y apoyo al resto de compañeros "*vecinos*" de los departamentos de Geología, Química y Microbiología.

Gracias a mis padres, a mi hermana y hermano, tendría que hacer tres tesis para agradecerles todo lo que han hecho por mí en este tiempo. Muchísimas gracias a mis amigos, aquellos que me conocen y soportan desde hace ya más de 15 años. A Diego y JL, gracias, y ahora... ¿Buenos aires?, ¿*carpe noctem*?, ¿mollete?, suerte con *la vuestra*. Gracias a mis compañeros de Ana Lógica. *Grazie mille a tutti i miei amici italiani, soprattutto Vale e Paoletta.*

Un agradecimiento, también recuerdo, muy afectuoso a las personas que me han acompañado personal y *emocionalmente* durante estos años de trabajo, *a ellas*.

Gracias a Ray Davies, Beatles, Brian Wilson, Charles Mingus, Burt Bacharach, Johan de Meij, Mahler, Belle and Sebastian, Miles Davis, Wilco, Eddie Cochran, Josh Rouse... Gracias también, Soledad y Silencio.

Esta tesis ha sido financiada por los proyectos REN2003-07375 y CTM2007-65716 del Ministerio de Educación y Ciencia así como el Grupo de Investigación RNM 179 de la Junta de Andalucía. Agradecer igualmente la ayuda económica aportada por el Programa de Doctorado de Ciencias de la Tierra y el interés mostrado por Antonio Garcia Casco como coordinador del programa.

RESUMEN

Uno de los principales problemas que se plantean a la hora de evaluar los efectos de la contaminación en el ambiente es la cuantificación de su impacto en ecosistemas. Para ello se pueden utilizar diferentes bioindicadores con el fin de determinar el riesgo o daño causado por los contaminantes en organismos. En esta tesis se estudia la idoneidad del tejido óseo como indicador del efecto que ciertos contaminantes tienen sobre la salud de organismos, así como su utilidad como registro de los niveles de contaminación en el ambiente. En particular, este trabajo se centra en el estudio de los efectos tóxicos que ciertos contaminantes producen en el tejido óseo, tanto en poblaciones silvestres como en animales de laboratorio en experimentos controlados de exposición inducida. El objetivo principal de esta tesis es la determinación de parámetros composicionales y texturales que permitan describir idóneamente la composición mineral del tejido óseo y que a su vez puedan ser empleados para evaluar el impacto provocado en la salud de los organismos expuestos a contaminantes, en particular metales pesados y compuestos clorados. Con este propósito se necesita desarrollar metodologías analíticas adecuadas que permitan determinar parámetros cuantitativos que caractericen adecuadamente el tejido óseo.

El hueso es un tejido calcificado metabólicamente activo en constante remodelación. Este biomaterial está compuesto de una matriz orgánica (fundamentalmente colágeno de tipo I) y a un componente mineral (nanocristales de hidroxiapatito carbonatado) en proporciones que varían con la edad y su localización dentro del esqueleto del organismo. Por otra parte, el mineral del hueso es la principal reserva de calcio y fósforo en el organismo. Estos elementos desempeñan un papel fundamental en numerosas funciones fisiológicas y su homeostasis está

regulada por mecanismos que controlan la formación y el metabolismo del tejido óseo. Esta mineralización ósea se encuentra regulada por una compleja serie de procesos de formación y resorción del tejido que pueden alterarse por diferentes factores ambientales, genéticos y endocrinos dando lugar a composiciones anormales o patologías del hueso. En relación con lo anterior existe un interés creciente en investigaciones médicas y toxicológicas en el estudio los posibles factores que alteran la correcta mineralización del hueso. Numerosos trabajos toxicológicos demuestran como la exposición a contaminantes (*v.gr.* metales pesados, compuestos organoclorados) pueden causar defectos y malformaciones óseas tanto en especies silvestres como en animales modelo en experimentos controlados en laboratorio. Los contaminantes estudiados en esta tesis, PCB, TCDD y metales pesados, pueden actuar como disruptores endocrinos alterando tejidos reproductivos y otros tejidos regulados por el sistema endocrino, como es el caso del tejido óseo. Asimismo, estudios recientes muestran como la exposición a metales pesados afecta directa e indirectamente a los mecanismos que regulan la formación y desarrollo del hueso. Metales pesados ,como el plomo, el mercurio o el cadmio, tiene la capacidad de actuar como potentes nefrotóxicos que, de esta manera, alteran la función normal de riñones, órganos encargados de producir la forma activa de la vitamina D, que juega a su vez un papel fundamental en la homeostasis del calcio en organismos. En concreto, los resultados presentados en la tesis confirman como la exposición al plomo, en poblaciones de aves silvestres (*Neophron percnopterus*, *Alectoris rufa*), altera significativamente la composición química del hueso en aquellos individuos afectados por dicha toxicidad. Específicamente, los datos obtenidos a partir de la espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) revelaron como la exposición al plomo induce una reducción en el grado de mineralización

del hueso, que disminuye al aumentar las concentraciones de plomo analizadas en el hueso.

La toxicidad debida a la exposición al plomo puede afectar directa e indirectamente al metabolismo del tejido óseo alterando los procesos de formación y resorción del tejido óseo. Estas alteraciones inducen a su vez una movilización anormal del calcio en el tejido óseo provocando, consecuentemente, una desmineralización del hueso. De hecho, la exposición al plomo, al igual que a otros metales pesados como el aluminio o el cadmio, se considera un factor ambiental de riesgo para el desarrollo de osteoporosis. Por otra parte, la exposición a compuestos clorados (*v.gr.* DDT, PCB, dioxinas), que actúan como disruptores endocrinos, pueden igualmente afectar negativamente a la formación y composición del hueso. Esto es debido a que el metabolismo del hueso dependerá del estado hormonal del individuo, siendo el tejido óseo estrógeno/andrógeno dependiente (*v.gr.* después de la menopausia u ovariectomía existe un incremento en la pérdida de la masa ósea debida una deficiencia de estrógeno). Uno de los estudios incluidos en la tesis demuestra como la espectrometría FTIR puede revelar cambios significativos en la composición mineral del hueso en una población de aves silvestres (*Rallus longirostris*) debido a la exposición a compuestos mercuriales y clorados. Por otra parte, también se demostró como la exposición controlada a PCB126 y TCDD, en ensayos toxicológicos en laboratorio en ratas del tipo Sprague-Dawley, alteró significativamente la composición química del mineral del hueso a nivel molecular. Los efectos específicos encontrados pueden ser explicados como una alteración de los procesos de remodelación ósea, debida a la alteración metabólica provocada por la toxicidad inducida por la exposición a PCB/TCDD. Además, la tesis evidencia como la exposición a PCB induce una alteración en los niveles séricos de tiroxina y vitamina D. En este sentido,

estos tóxicos provocan una serie de efectos asociados a estrés oxidativo en el organismo, que pueden llegar a afectar notablemente el metabolismo normal del tejido óseo.

En conclusión, esta tesis propone y evalúa procedimientos y técnicas analíticas que permiten obtener información cuantitativa sobre el estado de salud de organismos expuestos a tóxicos usando el tejido óseo como bioindicador. Los trabajos presentados desarrollan la metodología necesaria combinando la espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier, espectrometría de absorción atómica, microscopía electrónica de transmisión, espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo y espectrometría de masas de razones isotópicas, como técnicas más informativas para caracterizar de forma completa y detallada la composición mineral y cristalina del tejido óseo. Los resultados obtenidos en los diferentes casos de estudio muestran como el empleo de estas técnicas complementarias constituye un método apropiado para estudiar posibles alteraciones en la mineralización del tejido óseo debidas a la exposición a contaminantes que producen alteraciones metabólicas en organismos. Estas herramientas resultan especialmente adecuadas para describir las variaciones potenciales en el hueso debidas a la exposición a tóxicos, así como para estudiar su relación con alteraciones en los niveles de hormonas que regulan la mineralización del tejido óseo.

PALABRAS CLAVE: biomineralización, tejido óseo, plomo, mercurio, PCB, DRX, TCDD, FTIR, TEM, toxicidad, perdiz roja, gallinuela de manglar, buitre, roedor.

ABSTRACT

One of the main difficulties when evaluating the effects of contamination in the environment is the quantification of its impact in the ecosystems. Different bioindicators can be used to determine the risk or damage caused by contaminants in organisms. In this thesis dissertation, it is proposed to use bone tissue as indicator for studying the effect that certain contaminants have on the health of organisms and, likewise, as a suitable record of the contamination in the environment. In particular, the present thesis focuses on studying the toxicity-related effects of certain contaminants on bone tissue on wild animals in their natural habitat as well as animal models in controlled laboratory experiments. The main objective of the current work is to determine compositional and textural parameters of bone tissue which can be used to evaluate the impact of toxicants on the health of exposed organisms, specifically heavy metals and chlorinated compounds. For this purpose, it is necessary to develop suitable analytical methodologies allowing those quantitative determinations.

Bone, the material used as a bioindicator, is a metabolically active calcified tissue in constant remodeling. It is composed of an organic matrix (mainly collagen type I) and a mineral component (nanocrystalline carbonate hydroxylapatite) in proportions varying with age and location within the skeleton. The mineralized component of bone tissue is mainly composed of calcium and phosphorus, elements which are very important for many metabolic functions and whose homeostasis is mainly regulated by mechanisms coordinated by bone tissue metabolism which is in turn regulated by kidneys and parathyroid glands. Bone mineralization is regulated by a complicated array of feedback processes which can be altered by different genetic, endocrine and environmental factors,

resulting in abnormal or pathological composition of bone. Regarding the later, there is an increasing interest in medical and toxicological research related to the factors that alter bone mineralization. From toxicology studies, it is well known that environmental pollutants (e.g., heavy metals, organochlorines) cause skeletal defects and malformations in laboratory models and wild animals. The contaminants of interest proposed in this thesis, TCDD, PCBs and heavy metals, have endocrine-disrupting properties, affecting reproductive tissues and other endocrine-regulated tissues, such as bone tissue. For instance, recent studies indicate that heavy metals may exert both direct and indirect controls on bone turnover. Hg, Pb and Cd are nephrotoxic, and are known to affect Ca metabolism; kidneys produce the active form of vitamin D, which is involved in Ca homeostasis. In particular, the results reported in this thesis confirmed that exposure to lead in exposed wild bird populations (*Neophron percnopterus*, *Alectoris rufa*) have altered bone chemical composition on those affected populations. Specifically, FTIR spectrometry data revealed a related change in the degree of bone mineralization which decreased with lead loads analyzed in bone. This trend could be due to a modification of normal bone tissue metabolism induced by lead exposure. In this sense, lead toxicity can directly affect bone turnover by altering osteoblast and osteoclast function. Additionally, lead may indirectly affect bone metabolism and bone cell function by reducing plasma levels of active vitamin D and parathyroid hormone. All these alterations can induce an abnormal mobilization of calcium and, consequently, a demineralization of bone tissue. In fact, lead, as other heavy metals such as cadmium or aluminum, are considered environmental risk factors for osteoporosis. On the other hand, exposure to organochlorines (e.g., DDT, PCB, dioxins), which are endocrine disrupters, can also negatively alter bone formation and composition. Bone metabolism is both estrogen- and androgen-dependent

(i.e., after menopause or ovariectomy there is accelerated bone loss caused mainly by estrogen deficiency). One of the presented manuscripts demonstrates how FTIR spectrometry can reveal significant changes in bone mineral composition in wildlife birds (*Rallus longirostris*) due to the presence of chlorinated and mercury compounds in the environment. Moreover, we also show that treatment with PCB126 and TCDD in controlled experiments in exposed Sprague-Dawley rats significantly altered the chemical composition of bone mineral at the molecular level. These effects can be explained as an alteration in the bone remodeling process due to PCB/TCDD toxicity-induced metabolic alteration. Additionally, the thesis also documents that PCB exposure induced an alteration of thyroid hormone and vitamin D serum levels. In this sense, these toxicants may induce an array of effects associated to an oxidative stress affecting normal bone tissue metabolism.

In conclusion, this thesis proposes different analytical techniques and procedures in order to gather quantitative information about the health of affected organisms by toxicants. The present studies develop the use and apply of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Atomic Absorption Spectroscopy, Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, Isotope Ratio Mass Spectrometry and Transmission Electron Microscopy techniques that are informative about the mineralogical composition and crystalline properties of bone tissue. The results obtained from the application of these complementary techniques constitute an appropriate methodology to give insights about possible alterations on bone mineralization due to the exposure to contaminants in organisms. These results are suitable for describing the potential variations in bone due to exposure to toxicants and for studying its relation with alterations in the hormones controlling bone mineralization.

KEYWORDS: biomineralization, bone tissue, lead, mercury, PCB, TCDD, XRD, FTIR, TEM, toxicity, partridge, clapper rail, vulture, rodent.

LISTA DE MANUSCRITOS

Esta tesis está basada en los siguientes manuscritos, que aparecerán referidos en el texto por su asignación en números romanos:

- I.** Effect of *in ovo* exposure to PCBs and Hg on clapper rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia (2006) Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., **Alvarez-Lloret, P.**, Gaines, K.F. *Environmental Science and Technology* 40 (16), 4936-4942.

Pag. 139

- II.** Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources. Gangoso, L., **Alvarez-Lloret, P.**, Rodríguez-Navarro, A.B., Mateo, R., Hiraldo, F., Donázar, J.A. *Environmental Pollution (In press)*.

Pag. 147

- III.** Short-term exposure to dioxin impairs bone tissue in male rats. Lind, P.M., Wejheden, C., Lundberg, R., **Alvarez-Lloret, P.**, Hermsen, S.A.B., Rodriguez-Navarro, A.B., Larsson, S., Moncek F., Rannug, A. *Submitted to Chemosphere*.

Pag. 177

- IV.** Effects of 3,3',4,4', 5 - pentachlorobiphenyl (PCB126) on vertebral bone mineralization and on thyroxin and vitamin D levels in Sprague-Dawley rats. **Alvarez-Lloret, P.**, Lind, P.M., Nyberg, I., Örberg, J., Rodríguez-Navarro, A.B. *Submitted to Toxicology Letters*.

Pag. 199

- V.** Effect of lead-shot ingestion on bone mineralization in a population of red-legged partridge (*Alectoris rufa*). **Alvarez-Lloret, P.**, Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., Ferrandis, P., Mateo, R. *Manuscript*.

Pag. 223

Publicaciones adicionales no incluidas en la tesis:

- VI.** Automatic crystal size determination in the micrometer range from spotty X-ray diffraction rings of powder samples (2006) Rodriguez-Navarro, A.B., **Alvarez-Lloret, P.**, Ortega-Huertas, M., Rodriguez-Gallego, M. *Journal of the American Ceramic Society* 89 (7), 2233-2238.
- VII.** Microstructure and crystallographic-texture of giant barnacle (*Austromegabalanus psittacus*) shell (2006) Rodriguez-Navarro, A.B., CabraldeMelo, C., Nelson Batista, N., Morimoto, N., **Alvarez-Lloret, P.**, Ortega-Huertas, M., Fuenzalida, V.M., Arias, J.I, Wiff, J.P., Arias, J.L. *Journal of Structural Biology* 156 (2), 355-362.
- VIII.** Evolution of the microstructure and crystallographic orientation during shell growth in *Psilunio littoralis* and *Nautilus belauensis* (2008) **Alvarez-Lloret, P.**, Rodriguez-Navarro, A. B., Checa, A.G. *Mineralogical Magazine* 72, 163-167.
- IX.** The crystalline properties of injection molded polyamide-6 and polyamide-6/montmorillonite nanocomposites. Yebra-Rodríguez, A., **Alvarez-Lloret, P.**, Cardell, C., Rodríguez-Navarro, A.B. *Applied Clay Science (In press)*.

LIST OF MANUSCRIPTS

This thesis is based on the following manuscripts, which will be referred to in the text by their roman numerals:

- I.** Effect of *in ovo* exposure to PCBs and Hg on clapper rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia (2006) Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., **Alvarez-Lloret, P.**, Gaines, K.F. *Environmental Science and Technology* 40 (16), 4936-4942.

Pag. 139

- II.** Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources. Gangoso, L., **Álvarez-Lloret, P.**, Rodríguez-Navarro, A.B., Mateo, R., Hiraldo, F., Donázar, J.A. *Environmental Pollution* (In press).

Pag. 147

- III.** Short-term exposure to dioxin impairs bone tissue in male rats. Lind, P.M., Wejheden, C., Lundberg, R., **Alvarez-Lloret, P.**, Hermsen, S.A.B., Rodriguez-Navarro, A.B., Larsson, S., Moncek F., Rannug, A. *Submitted to Chemosphere*.

Pag. 177

- IV.** Effects of 3,3',4,4', 5 - pentachlorobiphenyl (PCB126) on vertebral bone mineralization and on thyroxin and vitamin D levels in Sprague-Dawley rats. **Alvarez-Lloret, P.**, Lind, P.M., Nyberg, I., Örberg, J., Rodríguez-Navarro, A.B. *Submitted to Toxicology Letters*.

Pag. 199

- V.** Effect of lead-shot ingestion on bone mineralization in a population of red-legged partridge (*Alectoris rufa*). **Alvarez-Lloret, P.**, Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., Ferrandis, P., Mateo, R. *Manuscript*.

Pag. 223

Additional publications not included in the thesis:

- VI.** Automatic crystal size determination in the micrometer range from spotty X-ray diffraction rings of powder samples (2006) Rodriguez-Navarro, A.B., **Alvarez-Lloret, P.**, Ortega-Huertas, M., Rodriguez-Gallego, M. *Journal of the American Ceramic Society* 89 (7), 2233-2238.
- VII.** Microstructure and crystallographic-texture of giant barnacle (*Austromegabalanus psittacus*) shell (2006) Rodriguez-Navarro, A.B., CabraldeMelo, C., Nelson Batista, N., Morimoto, N., **Alvarez-Lloret, P.**, Ortega-Huertas, M., Fuenzalida, V.M., Arias, J.I, Wiff, J.P., Arias, J.L. *Journal of Structural Biology* 156 (2), 355-362.
- VIII.** Evolution of the microstructure and crystallographic orientation during shell growth in *Psilunio littoralis* and *Nautilus belauensis* (2008) **Alvarez-Lloret, P.**, Rodriguez-Navarro, A. B., Checa, A.G. *Mineralogical Magazine* 72, 163-167.
- IX.** The crystalline properties of injection molded polyamide-6 and polyamide-6/montmorillonite nanocomposites. Yebra-Rodríguez, A., **Alvarez-Lloret, P.**, Cardell, C., Rodríguez-Navarro, A.B. *Applied Clay Science (In press)*.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AAS / EAA	Espectrometría de Absorción Atómica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AhR	Receptor de Aril-hidrocarbano
ALP	Fosfatasa Alcalina
CI	Índice de Cristalinidad
ER	Receptores de Estrógeno
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano
DRX	Difracción de Rayos X
FT4	Tiroxina Libre
FTIR	Infrarrojo por Transformada de Fourier
I	Intensidad
ICP-MS / E-PAI	Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo
ICP-OES	Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma de Acoplamiento Inductivo
IR	Infrarrojo
IRMS	Espectrometría de Masas de Razones Isotópicas
LASER	Amplificación de Luz por Emisión Estimulada de Radiación
T	Transmitancia
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
TG	Termogravimetría
TT4	Tiroxina Total
PCB	Policlorobifenilo
PCDD	Policlorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
PCDF	Policlorodibenzofurano
PINP	Péptido Amino Terminal del Procolágeno
pQCT	Tomografía Computada Periférica Cuantitativa
UDP-GT	Uridín Difosfato Glucuronil Transferasa

1. Introducción

“Omnia sunt venena, nihil est sine veneno. Sola dosis facit venenum”

Theophrastus Bombastus von Hohenheim, Paracelso (1493-1541).

En este capítulo introductorio a la memoria de tesis doctoral se describen algunos aspectos fundamentales de los procesos y tipos de biomineralización para, posteriormente, detallar las características del hueso como tejido mineralizado. A continuación se realiza una aproximación a los aspectos y conceptos de mayor interés de la toxicología incluyendo su relación con los procesos de mineralización ósea. Asimismo, se analizan los diferentes perfiles toxicológicos de los contaminantes estudiados. Finalmente, se definen la justificación y objetivos desarrollados durante los manuscritos que constituyen la memoria de tesis.

1.1. Biomineralización

1.1.1. Aspectos generales

La biomineralización es el proceso de formación de minerales por organismos (Crick, 1989). Aunque la mayoría de los organismos no forman estos depósitos minerales el fenómeno es ampliamente frecuente en un buen número de especies. Hasta el momento se conocen hasta 55 filos, distribuidos entre los cinco reinos, capaces de sintetizar alguno de estos minerales (Dove *et al.*, 2003). Estos organismos son capaces de sintetizar o inducir más de 60 tipos de minerales diferentes. Estos materiales biogénicos, y sus procesos de formación, son objeto de estudio por un gran número de científicos cuyas áreas de estudio abarcan campos tan multidisciplinarios como la física, la medicina, la microbiología o la

fisiología entre otros. Entre las funciones que desempeñan estos minerales en los seres vivos podemos encontrar desde aquellos que sirven como reservorios para nutrientes generados por el metabolismo del organismo, estructuras y/o cubiertas de protección (como es el caso de la formación de conchas en moluscos), como soporte estructural (exoesqueletos o endoesqueletos) e incluso como sensores gravitatorios (otolitos de carbonato cálcico en el oído interno de algunos animales), o magnéticos (como el caso de nanocristales de magnetita en ciertas bacterias) entre otras tantas y diversas funciones (Mann, 2001).

Los biominerales, a diferencia de sus análogos geológicos, no son simples formaciones inorgánicas. El análisis químico de la mayoría de los biominerales estudiados hasta el momento pone de manifiesto que asociado a la formación de estos materiales existe una presencia fundamental de materia orgánica. Este contenido en materia orgánica puede variar en rangos que oscilan entre el 0.5%, en el caso de perlas y nácar en moluscos, hasta el 35% en el tejido óseo de vertebrados (Crick, 1989). La presencia de materia orgánica define la naturaleza y composición química del material así como su relación con la fase mineral (Lowenstam & Weiner, 1989). Aunque en la actualidad se posee gran cantidad de información acerca de la composición y estructura de los biominerales, y como se da la especificidad entre unas especies a otras, todavía existe un gran desconocimiento de los mecanismos concretos de formación y crecimiento de éstos, su relación con los mecanismos de nucleación de cristales y su relación con la matriz orgánica. Precisamente, esta interacción orgánico-inorgánico define la formación y estructura del material y confiere a estos biominerales unas propiedades particulares y específicas sin parangón en materiales sintéticos.

La biomineralización, o formación de un sólido bioinorgánico en un sistema biológico, consiste en una reacción de precipitación en medio

acuoso, en la mayoría de los casos, exquisitamente regulada por la actividad biológica del organismo y que es fruto de su actividad celular (Simkiss & Wilbur, 1989). En este proceso, en el que se produce un determinado sólido o precipitado de origen biológico, es necesario que se cumplan tres condiciones fundamentales: *sobresaturación* (que la disolución acuosa en la que ocurre esta precipitación se encuentre sobresaturada), *nucleación* (presencia de núcleos o gérmenes de precipitación en la disolución) y *crecimiento* (condiciones adecuadas para que ocurran procesos de crecimiento de cristales) (Mann, 2001). La condición de sobresaturación es un requisito termodinámico fundamental para que la precipitación ocurra de forma espontánea, en cuyo caso contrario, se podría producir una redisolución del material formado. El segundo de los requisitos para la formación del precipitado mineral, presencia de núcleos y gérmenes de nucleación, es determinante en la cinética global del proceso de formación del precipitado y la posterior naturaleza de la fase sólida que se formará finalmente. Este complejo proceso de nucleación de la fase mineral es la clave fundamental en la formación del precipitado aunque su preciso funcionamiento es aún desconocido en la actualidad al depender de muchos factores tanto intrínsecos al organismo (*v.gr.* mecanismo de regulación de iones - homeostasis-, presencia de moléculas orgánicas en disolución) como extrínsecos (*v. gr.* temperatura, presión, perturbaciones mecánicas). La última de las condiciones, crecimiento de la fase inorgánica, depende tanto de la cinética como de la termodinámica del sistema. El resultado final dependerá en gran medida del grado de sobresaturación que alcance la disolución inicial y del mantenimiento de ésta durante el proceso, así como del número de núcleos o gérmenes que se hayan podido originar en la fase previa.

Los procesos anteriormente descritos dependerán además en gran parte de la actividad celular del organismo en que suceda el proceso de precipitación del mineral. El grado de control que ejerce el organismo sobre la precipitación de determinados biominerales podrá variar dentro de unos ciertos límites, existiendo variables que el organismo en sí mismo será incapaz de controlar. La actividad biológica, y consecuentemente la de las células implicadas en el proceso de formación y crecimiento de biominerales, implica un continuo intercambio y regulación de materia con el ambiente externo (intercambio de nutrientes y excreción o eliminación de productos de desecho) (Simkiss & Wilbur, 1989). El proceso de *mineralización inducida biológicamente* consiste precisamente en este proceso de excreción de productos que pueden dar lugar a la formación de un precipitado en el medio, ya sea como fruto de una simple precipitación (al alterar la sobresaturación local del medio e inducir la precipitación), o como resultado de reacciones químicas de diferente naturaleza que den igualmente como producto una precipitación inorgánica en el medio (Dove *et al.*, 2003). En este caso, aún estando implicado un organismo en el proceso de formación del precipitado, no existe ningún control biológico que haya participado directamente en la formación del precipitado inorgánico en el medio. En este tipo de biomineralización los precipitados formados adquieren tamaños y formas muy diversas, características de la naturaleza del proceso y condiciones químicas del medio que ha dado lugar a su formación. Esta mineralización inducida es frecuente en bacterias, hongos y protistas, aunque también puede darse en algunos animales superiores.

El proceso de biomineralización más conocido, de hecho el más extendido y de mayor importancia, es el de *mineralización controlada biológicamente*. En este caso los diferentes procesos de mineralización dan lugar a la formación de fases cristalinas específicas en cada especie y

cristales con morfología y tamaño constantes y relacionada con la función fisiológica específica que desempeñan en el organismo. Buenos ejemplos de éstos procesos son la formación de huesos, dientes o conchas de moluscos (Dove *et al.*, 2003). Estos biominerales se caracterizan por poseer unas propiedades cristal químicas específicas y constantes en cada especie por lo que se piensa puede estar regulada genéticamente. Esta mineralización controlada biológicamente se da en organismos unicelulares, como algas o protozoos, y aún comúnmente en organismos multicelulares. Solo existe un caso conocido de biomineralización controlada en bacterias, el cual consiste en la formación de cristales de *magnetita* (Fe_3O_4) a partir de la actividad microbiológica de bacterias *magnetotácticas* (Blakemore, 1975).

La principal dificultad a la hora de estudiar estos procesos de mineralización biológica es comprender cómo las moléculas orgánicas regulan la nucleación y crecimiento de estos precipitados bioinorgánicos y en qué manera éstas se incorporan y dan forma a tejidos mineralizados. Durante estos procesos de biomineralización el sólido inorgánico precipita sobre una matriz o superficie formada por macromoléculas orgánicas de diferente naturaleza (Mann *et al.*, 1989). Entre éstas predominan las proteínas, aunque de igual manera pueden intervenir polisacáridos o lípidos. Estas macromoléculas influyen de forma determinante en la formación del mineral al delimitar el espacio de la mineralización y controlar a su vez la nucleación y el proceso de crecimiento cristalino. Las moléculas orgánicas constituyentes pueden clasificarse en dos grupos principales según su solubilidad (Mann, 2001): (1) **macromoléculas estructurales**, insolubles en agua (en este grupo encontramos algunas de naturaleza protéica, como el colágeno en el tejido óseo o la conquitina en conchas, o polisacáridos, como la quitina en crustáceos o la celulosa en plantas), y (2) **macromoléculas ácidas**, solubles

en agua (formado por un numeroso grupo de proteínas, fosfoproteínas y glucoproteínas globulares presentes en casi todos los tejidos mineralizados aunque en proporciones minoritarias).

1.1.2. Ejemplos biomineralización

La distribución de los biominerales más comunes en los 5 reinos muestra como 37 de estos minerales son formados por animales, 10 por protistas, 24 por móneras (bacterias y algas verdeazuladas), 11 por plantas vasculares y 10 por hongos (Dove *et al.*, 2003). El catión calcio es el ión mayoritariamente presente en la composición de biominerales –contenido en más del 50 % de los biominerales conocidos en la actualidad-. El calcio es fundamental para la mayoría de las funciones celulares del metabolismo y está presente en la mayoría de los procesos de formación de precipitados bioinorgánicos (Simkiss & Wilbur, 1989, Berridge *et al.*, 1998). Esta predominancia del ión calcio, en los procesos de biomineralización, es la que hace referirnos de forma generalizada a éstos con el término “cálculos” (o “calcificación”) (Dove *et al.*, 2003). Entre los biominerales más comunes encontramos: carbonatos, fosfatos, algunos óxidos de hierro y sílice amorfa. A continuación se describen brevemente cada uno de estos tipos de biominerales, así como algunos ejemplos de organismos en los que encontramos cada caso:

a) Carbonatos

Los minerales del carbonato cálcico son los tipos más comunes en los procesos de mineralización biológica, tanto en términos de cantidad producida, como por su distribución en taxones (Lowenstam & Weiner, 1989). De los ocho polimorfos de carbonatos hasta ahora conocidos siete de ellos son cristalinos y uno amorfo (ver tabla 1.1). Entre los polimorfos anhidros destacan la calcita, el aragonito y la vaterita, este último mucho

menos abundante y raro que los anteriores. También existen organismos que mineralizan calcita magnesiana de composición variable, en la que los iones magnesio sustituyen isomórficamente a iones calcio en la estructura cristalina.

Tabla 1.1. Nombre y composición química de los minerales de carbonato cálcico producidos por acción biológica.

<i>Nombre</i>	<i>Fórmula</i>
Calcita	CaCO_3
Calcita magnesiana	$(\text{Mg}_x \text{Ca}_{1-x}) \text{CO}_3$
Aragonito	CaCO_3
Vaterita	CaCO_3
Monohidrocalcita	$\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Dolomita	$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$
Hidrocerusita	$\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2 (\text{OH})_2$
Carbonato cálcico amorfo	$\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o CaCO_3

b) Fosfatos

Los fosfatos, fundamentalmente de calcio, comprenden cerca de un 25% de los tipos de minerales de origen biológico (ver tabla 1.2). Exceptuando la estruvita y la brucita, el resto de minerales de fosfato son producto de procesos de biomineralización controlada. El mineral de fosfato más conocido de este tipo es el hidroxiapatito carbonatado, también conocido como dahlita (Lowenstam & Weiner, 1989). Este mineral está presente en dientes y huesos de vertebrados así como en la concha de braquiópodos inarticulados. Posteriormente se describirá de forma detallada la composición y estructura del apatito, al conformar la parte mineral fundamental en la estructura del tejido óseo.

Tabla 1.2. Nombre y composición química de los minerales de carbonato cálcico producidos por acción biológica.

Nombre	Fórmula
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$
Brucita	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Francolita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$
Hidroxiapatito carbonatado	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3(\text{OH})$
Whitlockita	$\text{Ca}_{18}\text{H}_2(\text{Mg, Fe})_2^{+2}(\text{PO}_4)_{14}$
Estruvita	$\text{Mg}(\text{NH}_4)(\text{PO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Vivianita	$\text{Fe}_3^{+2}(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
Fosfato cálcico amorfo	variable

c) Óxidos de hierro

La ferrihidrita (óxido de hierro (III) hidratado ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) es el más común entre los minerales que encontramos en el grupo de los óxidos de hierro (ver tabla 1.3). Este mineral se localiza en el núcleo de la ferritina, que sirve de proteína de almacenamiento de hierro en algunos mamíferos y plantas. Entre los biominerales de óxido de hierro destaca la magnetita, descrita por primera vez por Lowenstam en 1962. La magnetita es un mineral ferromagnético empleado por numerosos organismos marinos (Walker *et al.*, 1984), insectos (Gould *et al.*, 1978) y microorganismos, en bacterias magnetotácticas (Blakemore, 1975), como sistema de orientación o navegación. Un caso muy especial de mineralización de magnetita en tejidos se da en la rádula de los quitones (Lowestam, 1962). Entre los minerales de este grupo también encontramos hidróxidos de hierro como la goetita y lepidocrocita (Frankel & Blakemore, 1991).

Tabla 1.3. Nombres y composición química de los minerales de óxidos e hidróxidos de hierro producidos por acción biológica.

Nombre	Fórmula
Magnetita	Fe ₃ O ₄
Goetita	α- FeOOH
Lepidocrocita	γ- FeOOH
Ferrihidrita	Fe ₂ O ₃ .9H ₂ O

d) *Sílice amorfa*

Aunque la mayoría de los biominerales son cristalinos, un gran número de organismos unicelulares son capaces de producir extraordinarias estructuras de minerales amorfos, en particular de sílice amorfa (SiO₂ nH₂O). Entre ellas destacan las diatomeas y radiolarios que forman delicadas conchas porosas y microesqueletos (Dove *et al.*, 2003). Las espinas y nódulos de sílice (*fitolitos*) que aparecen en plantas superiores son también ejemplos del uso de este biomineral. La elección por los organismos de sílice amorfa en lugar de sales cristalinas, como carbonatos o fosfatos, puede deberse a la ventaja que este material ofrece al poder moldearse en una gran variedad de complejas arquitecturas sin pérdida de resistencia a fracturas a lo largo de determinados planos cristalinos (Mann, 2001).

En cualquier caso, es verdaderamente sorprendente la capacidad de los organismo de seleccionar una determinada sustancia y cristalizarla en una forma polimórfica específica.

1.1.3. *El hueso como tejido mineralizado*

En la actualidad existe un interés científico creciente en el estudio del tejido óseo (Paschelis *et al.*, 1996; Bohannon *et al.*, 2000; Bohic *et al.*, 2000). Las líneas de investigación actuales buscan conocer los procesos fisicoquímicos, bioquímicos y fisiológicos que regulan la mineralización

del tejido óseo (Durant *et al.*, 2004; Basso *et al.*, 2005; Kandori *et al.*, 2005), estudiar la etiología de enfermedades óseas como la osteoporosis (Brown, 2005), la osteogénesis imperfecta (Millington-Ward *et al.*, 2005), osteomalacia (Faibish *et al.*, 2005), osteoesclerosis (White, 1998) y, en general, investigar en el desarrollo y síntesis de tejido óseo (Whetsell *et al.*, 1999; Kikuchi *et al.*, 2004).

El hueso es un tejido mineralizado altamente organizado caracterizado por poseer una extensa matriz extracelular en la cual se deposita un mineral análogo al hidroxapatito. Junto al cartílago, el hueso conforma el tejido conectivo. Dicho tejido desempeña tres funciones principales en vertebrados (Boskey, 1999):

a) *Mecánica*: soporte y sujeción de los músculos para la locomoción.

b) *Protección*: para órganos vitales y médula ósea

c) *Metabólica*: como reserva de iones (fundamentalmente calcio, magnesio y fosfato) para el mantenimiento de las principales funciones vitales celulares.

El hueso puede adoptar gran número de formas y tamaños con el fin de adquirir las funciones de protección y soporte mecánico sin poner en compromiso las necesidades de movilidad. Sus propiedades mecánicas derivan de la integración del mineral con la matriz orgánica de fibras colágenas, proteínas, lípidos, etc. (ver tabla 1.4). No obstante, la composición varía con la edad, localización anatómica, dieta y estado de salud del individuo. En general, para un mamífero adulto la composición del tejido óseo puede ser de un 50 a 70% mineral, 20-40 % matriz orgánica, 5-10% agua y <3% lípidos (Lian *et al.*, 2003). La matriz orgánica, predominantemente colágeno tipo I, provee de elasticidad y flexibilidad al hueso y determina su organización estructural. Tanto el colágeno como

las proteínas no colágenas asociadas al tejido óseo influyen en la forma en que sucede la mineralización del hueso. Las células responsables de la formación del hueso (*osteocistos*) reparan y remodelan el tejido óseo respondiendo a señales hormonales y metabólicas del organismo. Los lípidos, localizados en las membranas de dichas células, controlan el flujo de iones y están implicados estrechamente en el proceso de mineralización del tejido óseo. El agua es primordial para el mantenimiento de las propiedades y nutrición del tejido óseo y conjuntivo.

Tabla 1.4. *Proporciones relativas de los componentes de la matriz orgánica en el hueso (Simkiss & Wilbur, 1986).*

Constituyente	Porcentaje en peso (%)
Colágeno	88.0
Osteonectina	2.5
Ácido α -carboxiglutámico	1.5
Sialoproteína	1.0
Glicoproteína estructural	1.0
Proteoglicanos	1.0
Péptidos	0.8
Lípidos	0.4
α -HS-glicoproteína	0.4
Albúmina	0.3
Proteolípidos	0.3
Fosfoproteínas	0.2
Proteína morfométrica	0.1

El mineral del hueso, de composición y estructura análoga al apatito de origen geológico, provee al complejo óseo de rigidez y resistencia de carga frente a posibles presiones mecánicas. Los cristales de apatito de origen geológico pueden tener un gran tamaño, por el contrario los cristales del mineral del hueso son extremadamente pequeños (~200 nm en su dimensión mayor). El mineral del hueso posee numerosas impurezas (carbonato, magnesio, fosfato ácido) y vacantes (ausencia de

OH⁻). Estas pequeñas imperfecciones unidas al menor tamaño cristalino hacen que el apatito de origen biológico sea más soluble que su homólogo geológico permitiendo su función como almacén y fuente de iones calcio, fosfato y magnesio (Glimcher, 1998).

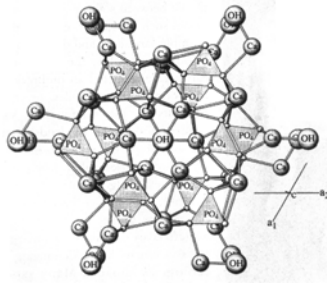


Figura 1.1. Vista de la estructura de hidroxiapatito a lo largo del eje *c*.

La composición del apatito de origen biológico es realmente compleja debido a la no estequiometría del mineral (no es composicionalmente puro) existiendo a menudo deficiencia en calcio y enriquecimiento en CO₃²⁻, el cual reemplaza a los iones PO₄³⁻ en diferentes sitios de la red (Wopenka & Pasteris, 2005). El mineral del hueso, a menudo conocido también como “*apatito carbonatado*”, puede ser de composición variable. Dependiendo de su composición se puede clasificar como (Strunz Classification, 1938): fluorapatito Ca₅[F(PO₄)₃], cloroapatito Ca₅[Cl(PO₄)₃], hidroxiapatito carbonatado Ca₅[(OH, O) (PO₄, CO₃)₃], fluorapatito carbonatado Ca₅[(F,O)(PO₄, CO₃)₃], etc. El mineral puede presentar numerosas sustituciones iónicas que modifican la red cristalina propia del apatito (ver figura 1.1 y 1.2) alterando el tamaño cristalino, la tasa de disolución y otras propiedades de diferente naturaleza (*v.gr.* dureza, estabilidad térmica). Su fórmula general, incluyendo dichas sustituciones, se puede expresar como (Mann, 2001):



donde [] indica la posible presencia de defecto en la red .

Tabla 1.5. Propiedades cristalográficas del hidroxiapatito: (*www.mindat.org*).

Sistema Cristalino	<i>Hexagonal</i>
Grupo Espacial	<i>P63/m</i>
Parámetros de celdilla	$a = 9.41, c = 6.88$
Razón	$a : c = 1 : 0.731$

Además del apatito se han identificado otras fases minerales precursoras en la formación del hueso. En los primeros estadios de formación y crecimiento del hueso y cartílago existen evidencias de la presencia de fases de fosfato cálcico amorfo. Otra fases, como el fosfato octacálcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$), también se han identificado en las etapas iniciales de formación del tejido óseo. Sin embargo estas fases son muy inestables y rápidamente se transforman en apatito (ver tabla 1.6).

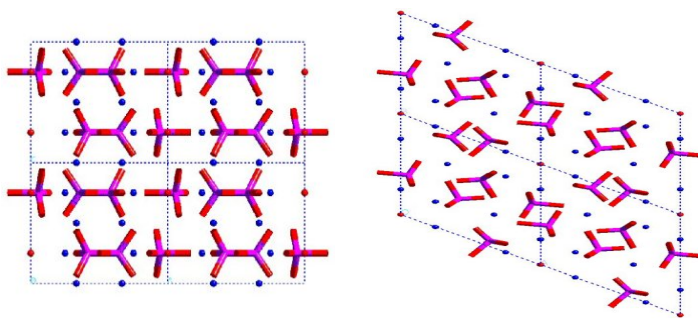


Figura 1.2. (izq.) Vista desde el eje *c* (001) de cuatro celdillas unidad de hidroxiapatito. 1.2. (dcha.) Vista desde el eje *a* o *b* (100, 010) de cuatro celdillas de hidroxiapatito.

Tabla 1.6. *Minerales del fosfato cálcico más comunes, fórmula, organismo así como la localización y función que desempeñan en cada organismo (Mann, 2001).*

Mineral	Formula	Organismo	Localización	Función
Hidroxiapatito	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Vertebrados Mamíferos Peces	Hueso Dientes Escamas	Endoesqueleto Cortar/moler Protección
Fosfato octacálcico amorfo	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$ <i>Variable</i>	Vertebrados Quitón Gastrópodos Bivalvos Mamíferos Mamíferos	Hueso/diente Dientes Revestimiento Agallas Mitocondria Leche	Fase precursora Fase precursora Triturar Fuente de iones Fuente de iones Fuente de iones

A medida que el hueso madura los cristales de apatito crecen y adquieren mayor perfección (contienen menor número de impurezas). El incremento en el tamaño de dichos cristales se debe al substancial incremento de iones en el cristal (crecimiento cristalino) y al estado de agregación de los cristales (Gehron & Boskey, 1996). El crecimiento de los cristales del mineral del hueso está gobernado en parte por la matriz colágena donde se depositan (Glimcher, 1998). Las proteínas no colágenas, que ligan los cristales del mineral a la matriz, pueden también regular su tamaño y forma. Estas proteínas igualmente tienen la función de adherir los *osteoclastos* (células de resorción del hueso) a la superficie del cristal (Gehron & Boskey, 1996). Otros constituyentes del tejido óseo, además de proteínas y lípidos, pueden determinar su crecimiento. Por ejemplo iones como el Mg^{2+} o Sr^{2+} , adquiridos a través de la dieta, pueden incorporarse directamente en el mineral, sustituyendo al Ca^{2+} en la red cristalina y produciendo cristales de menor tamaño y perfección que aquellos formados en su ausencia. Por otra parte, el carbonato está presente en la fase mineral del hueso a concentraciones solo superadas por el calcio y fosfato. El carbonato aumenta la disolución del mineral (Blitz & Pellegrino, 1977; Arends & Jongebloed, 1981) y desempeña un papel fundamental en numerosos procesos biológicos como el crecimiento de caries en el esmalte dental (Hallsworth *et al.*, 1973) y la resorción del

hueso (Glimcher, 1998). El carbonato (CO_3^{3-}), constituyente primordial en fluidos corporales, puede sustituir a los iones OH^- y PO_4^{3-} a medida que es adsorbido en la superficie de los cristales. Asimismo, la composición del mineral varía con la maduración del tejido óseo. Con la edad la cantidad total de carbonatos presentes en el mineral disminuye, decreciendo principalmente la cantidad de carbonato superficial (inestable) con la maduración del hueso (Rey *et al.*, 1991). En definitiva, la presencia de estas impurezas tiende a incrementar la imperfección del cristal, disminuir su tamaño y aumentar su solubilidad (Posner *et al.*, 1970; Grynpas, 1990). Por el contrario, la incorporación de fósforo incrementa su tamaño y, consecuentemente, reduce la solubilidad de los cristales de apatito en el medio. Además de la posible alteración de las propiedades del hueso debido a la incorporación de iones “*extraños*” en la red cristalina, los procesos y actividad celular también pueden influir en las propiedades del mineral. Por ejemplo, cuando la deposición del mineral se retrasa (*v.gr.* raquitismo hipofosfatémico), los cristales tienden a ser de mayor tamaño al normal (Boskey *et al.*, 1991).

Asimismo, el tamaño y la distribución de los cristales minerales en la matriz ósea influyen determinantemente en las propiedades mecánicas del hueso (Martin, 1993). La resistencia del hueso está directamente correlacionada con la densidad ósea, medida que describe la cantidad de tejido mineral presente en un área y depende de la arquitectura del hueso, de su contenido mineral y sus propiedades cristalinas (Currey *et al.*, 1996).

Por otra parte, en la regulación del tejido óseo determinadas hormonas, como el caso de los estrógenos, ejercen una función fundamental sobre el metabolismo y homeostasis del tejido óseo. Existen dos tipos de receptores de estrógeno (ER), ER- α y ER- β (Eriksen *et al.*, 1988). Ambos tipos de receptores se encuentran tanto en osteocistos como en osteoblastos (Onoe *et al.*, 1997; Krassas & Papadopoulou, 2001). El tejido

óseo es dependiente de los niveles de estrógeno en orden de mantener el equilibrio entre procesos anabólicos y catabólicos en el hueso. Los estrógenos pueden actuar sobre el metabolismo y la remodelación ósea por *mecanismos indirectos*, afectando la actividad o concentración de las hormonas calciotrópicas y modificando la absorción y excreción del calcio, y por *mecanismos directos*, actuando sobre los receptores en las células óseas. Un incremento de los niveles de estrógeno induce la formación de tejido mientras que una reducción de los niveles de estrógeno lleva asociada la reducción de la formación de tejido.

Los andrógenos, *v. gr.* testosterona, juegan igualmente un papel fundamental en la regulación del tejido óseo. Los andrógenos participan activamente en funciones de proliferación, producción de factores de crecimiento y citoquinas, producción de proteínas de matriz ósea como el colágeno, la osteocalcina y la osteopontina; estos factores se reconocen hoy en día como cardinales para la homeostasis del hueso llegándose a postular que la presencia de osteoporosis probablemente obedezca a un desequilibrio de citoquinas (Watrous & Andrews, 1989; Orwoll & Stribrska, 1991).

1.2. Toxicología

1.2.1. Toxicología general

La *toxicología* (del griego *toxikon* - veneno - y *logos* - estudio, ciencia -) es el estudio de los síntomas, tratamientos, detección, mecanismos y relación entre dosis, de un determinado tóxico, y sus posibles efectos adversos en organismos vivos (Landis & Yu, 2000). Entre estos tóxicos encontramos venenos vegetales, animales o minerales (toxinas naturales) y tóxicos artificiales o sintéticos. Normalmente la toxicología se considera una rama de la medicina, aunque actualmente se ha constituido como una

ciencia independiente e interdisciplinar que integra principios y métodos de muy diversos campos científicos: química, biología, farmacología, biología molecular o fisiología entre otros.

La *toxicidad* es una medida del grado en el que un determinado *tóxico* es capaz de producir efectos adversos en un organismo (Manahan, 1999). La toxicidad puede referirse a los efectos producidos por el tóxico en todo el organismo, como en el caso de animales, plantas o bacterias, o en una determinada subestructura, como el caso de células (*citotoxicidad*) u órganos (*organotoxicidad*, v.gr. hepatotoxicidad en hígado) (Niessink *et al.*, 1996). El principal criterio a tener en cuenta en el estudio de la toxicología es la *dosis*, entendida ésta como la cantidad de sustancia que entra en contacto o se introduce en el organismo. La *exposición* es la cantidad de sustancia disponible en el medio –aire, agua, suelo o alimento- que puede ser asimilada por el organismo (a través de la respiración, su contacto directo o indirecto, ingesta, etc.). La exposición incluye tanto la concentración de una determinada sustancia presente en el medio como el tiempo en que dicha sustancia permanece disponible en el organismo (concentración \times tiempo) (Baird, 1999).

La toxicidad de una sustancia puede verse alterada por diferentes factores, tales como la ruta o modo de administración (si el tóxico es aplicado sobre la piel, inhalado, ingerido o inyectado), el número de exposiciones (una única dosis o múltiples dosis a lo largo del tiempo), el estado físico del tóxico, la disposición genética de un individuo, así como otros muchos factores de diversa naturaleza (Manahan, 1999).

Existen numerosas variables relacionadas con la forma en que el organismo puede estar expuesto a sustancias tóxicas. La dosis es sin duda el concepto fundamental en el estudio de estos efectos tóxicos. Otro de estos factores de gran interés, es la *concentración* del tóxico, la cual puede

variar desde la sustancia pura hasta una solución diluida de un potente tóxico. La duración y frecuencia de exposición al tóxico en un determinado organismo son igualmente fundamentales. Esta tasa de exposición a la que un organismo se expone a un contaminante constituye una importante variable situacional y circunstancial a tener en cuenta en el estudio de perfiles toxicológicos (Albert *et al.*, 2003). Además de todos estos factores, la localización de la exposición en el organismo, así como la ruta de entrada y excreción pueden afectar de manera fundamental en la toxicidad de dicha sustancia.

La exposición a una determinada sustancia tóxica se puede clasificar en cuatro categorías fundamentales (Manahan, 1999). *Exposición aguda local* que aparece en una situación específica a lo largo de un período de tiempo que varía entre unos segundos a unas horas y puede afectar localizaciones específicas del organismo (particularmente en piel, ojos o membranas mucosas). Las mismas zonas pueden estar afectadas por una *exposición crónica local* en la que el tiempo de exposición al tóxico puede llegar a prolongarse durante años. La *exposición aguda sistémica* es la toxicidad en pequeñas dosis que pueden introducirse en el organismo y afectar al mismo en una localización remota a la vía de penetración del tóxico. La *toxicidad sistémica crónica* difiere de la anterior en que la exposición al tóxico se da durante un largo período de tiempo.

Las principales rutas o vías de exposición a un tóxico en los organismos son: la piel (*vía percutánea*), los pulmones (a través de la inhalación o respiración, *vía pulmonar*), o la boca (a través de la ingesta, *vía oral*) (Manahan, 1999). En la siguiente figura 1.3 se muestran las principales rutas y localizaciones de exposición, distribución y eliminación de tóxicos en organismos animales.

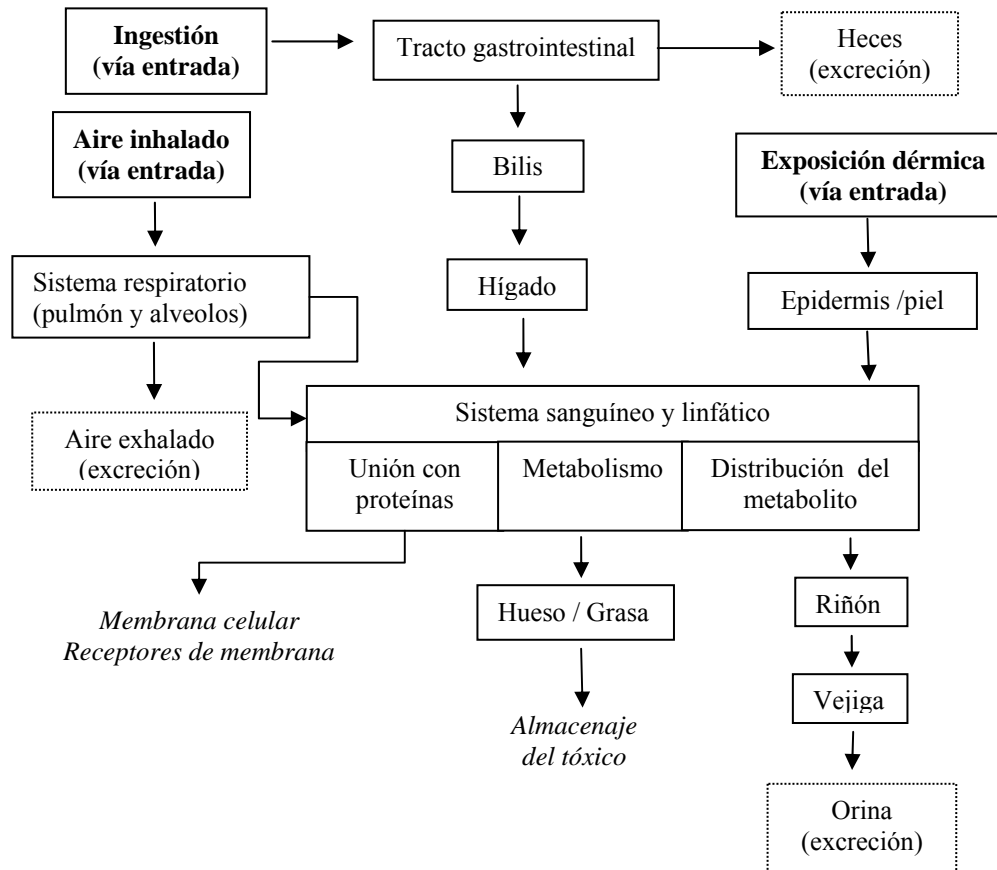


Figura 1.3. Principales vías de exposición, metabolismo, almacenaje, rutas de distribución y eliminación de sustancias tóxicas en organismos animales.

Los efectos biológicos producidos por dos o más sustancias tóxicas pueden ser diferentes en tipo y grado a los posibles efectos tóxicos producidos por las mismas sustancias de forma independiente. Es decir, la interacción entre sustancias químicas puede afectar su toxicidad. Ambas sustancias pueden actuar sobre la misma función fisiológica, o dos sustancias pueden competir por actuar sobre el mismo receptor. Cuando las mismas sustancias actúan sobre la misma función fisiológica sus efectos pueden ser simplemente aditivos o pueden actuar de forma *sinérgica* (el efecto total es mayor que la suma de cada uno de los efectos producidos individualmente por cada sustancia). La *potenciación* ocurre cuando una sustancia inactiva realza la acción de otra, por el contrario, un

antagonismo ocurre cuando una sustancia activa hace reducir el efecto de otra sustancia activa (Leikin & Paloucek, 1997).

Relación Dosis-Respuesta

Los tóxicos pueden tener un amplio espectro de efectos sobre los organismos. Cuantitativamente, estas variaciones varían en un rango determinado por los efectos mínimos a los cuales comienza o se activan determinados efectos sobre el organismo, determinado por la sensibilidad del organismo a pequeñas cantidades o dosis del tóxico, y los niveles a los cuales ocurre la muerte del individuo (efecto último) en los organismos expuestos a la sustancia o sustancias tóxicas (Baird, 1999). Numerosos factores son los que entran en juego en la evaluación de la relación *dosis-respuesta* en los organismos expuestos, concepto a su vez fundamental en el estudio de la toxicología. La dosis es la cantidad, usualmente en unidad de masa corporal, de un tóxico al que un organismo es expuesto (Kent, 1998). La *respuesta* es el efecto sobre el organismo resultado de la exposición a un determinado tóxico. Para definir la relación *dosis-respuesta* es necesario especificar la respuesta particular, como puede ser la muerte del organismo, así como las condiciones bajo las cuales se da la respuesta estudiada, como puede ser la duración de tiempo desde la administración de la dosis hasta la aparición de la respuesta. La respuesta dependerá en gran medida de la *sensibilidad* del organismo al tóxico en particular, existiendo individuos que pueden presentar mayor resistencia al tóxico (*hiposensibles*) o individuos de menor resistencia al mismo tóxico (*hipersensibles*) (Landis & Yu, 2000). La sensibilidad de los organismos a tóxicos específicos (variaciones en la respuesta de los individuos al mismo tipo de dosis) tiende a complicar en gran medida los estudios toxicológicos dado que no existirá una dosis característica o específica en la que se de una respuesta particular, incluso en poblaciones aparentemente homogéneas (Manahan, 1999).

1.2.2. *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* se emplea no sólo para organismos capaces de indicar con su presencia de forma cualitativa la presencia de contaminantes o perturbaciones en el medio. Este término 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 del 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 determinaran 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 analítico 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 1.4. 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 empleadas en especies introducidas como monitoras (seguimiento) en un determinado ambiente.

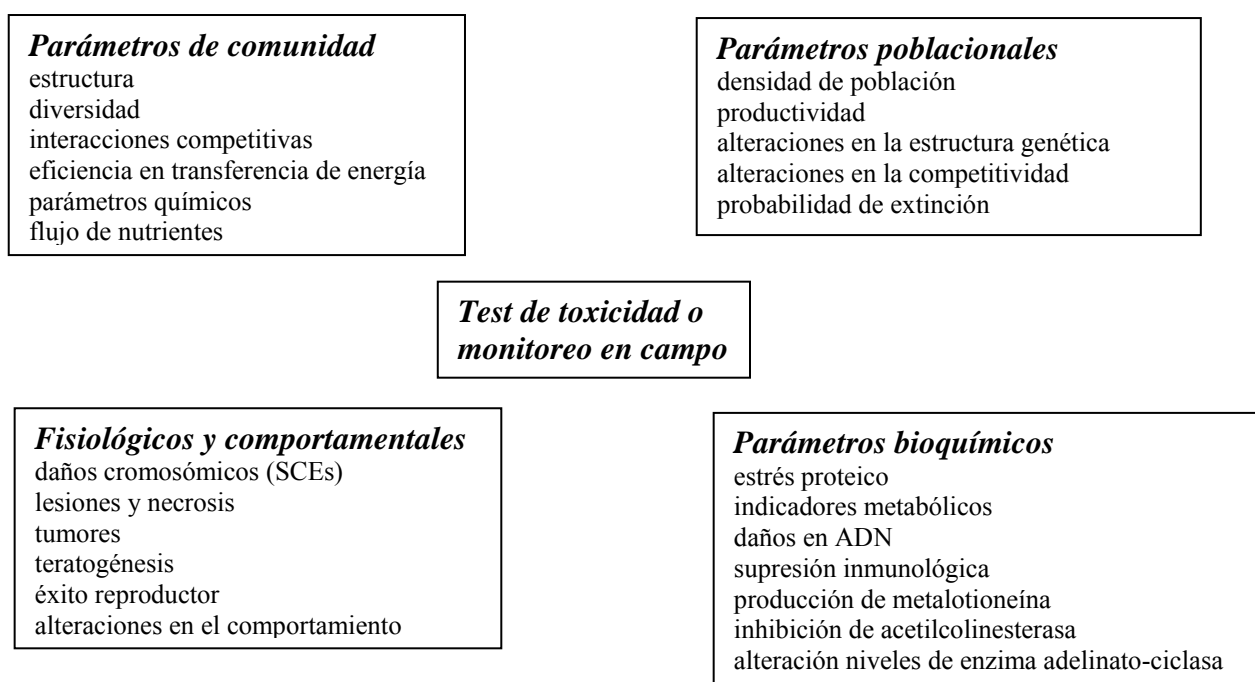


Figura 1.4. Métodos y medidas empleadas en biomonitorización.

En la actualidad, el estudio analítico de marcadores se ha desarrollado fundamentalmente con el desarrollo de técnicas y métodos de bioindicación toxicológica de tipo molecular y/o fisiológico (McCarthy & Shugart, 1990). En 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 de contaminantes (Shugart, 1990).

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).

1.2.3. 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, con el que se genera 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.*, 2002; 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 normal de osteocistos y osteoblastos. Por otra parte, el metabolismo del tejido óseo es dependiente de las hormonas sexuales. Por ejemplo, después de la menopausa u ovariectomía ocurre una aceleración de la pérdida de hueso causada por una deficiencia en estrógenos. De manera análoga, la exposición a compuestos organoclorados (*v.gr.* DDT, PCBs), que actúan como disruptores endocrinos, pueden afectar en 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 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 expuesto, como el caso del plomo en el tejido óseo. Muchos de estos organismos 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 en tejidos es un área de investigación emergente en las últimas décadas (Lind et al. 2000; 2004; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2002). 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.*, 2002; 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 (*v.gr.* cáscara de huevo, huesos...) y/o su homeostasis.

1.2.4. Perfiles toxicológicos de los contaminantes estudiados

- Plomo

El plomo es un metal pesado de gran persistencia ambiental, que puede ser incorporado al medio de múltiples formas, principalmente por actividades humanas de tipo industrial, minera y cinegética (Pattee, 1984). La difusión en el medio del plomo originado por actividades humanas, principalmente industriales, ha dado históricamente origen a afecciones de diferente naturaleza en la biota (Mateo *et al.*, 1997; Fant *et al.*, 2001).

Su toxicidad es muy elevada y se basa principalmente en su capacidad, común a otros metales pesados, de formar complejos o ligandos con compuestos orgánicos. El plomo se acumula principalmente en el tejido óseo, donde el ión Pb^{2+} sustituye con gran afinidad al ión Ca^{2+} (Scheuhammer, 1987; Ehle, 1993), alterando de esta forma la regulación hormonal del Ca y la función normal de osteoblastos en el tejido óseo (Ronis *et al.*, 2001). El plomo puede ocasionar efectos tóxicos sobre el tracto gastrointestinal, el sistema renal y el sistema nervioso central y periférico, así como generar interferencias con sistemas enzimáticos implicados en la síntesis del grupo *hemo* (Rubio *et al.*, 2004). El plomo circula en un 95-99% transportado por los hematíes, unido a la hemoglobina y otros compuestos. Se distribuye desigualmente en los

tejidos, cerca del 10% de plomo es almacenado en los tejidos blandos, conteniendo el tejido óseo el restante 90% (Scheuhammer, 1987). En elevadas concentraciones sanguíneas el almacenamiento de Pb en los tejidos puede verse favorecido pudiendo llegar a acumularse hasta en un 94% del Pb absorbido en el hueso. La sangre es la encargada de transferir el plomo a los huesos donde se fija siguiendo un metabolismo paralelo al del calcio. La semivida del plomo circulante es de unos 25 días, de unos 40 días en los tejidos blandos y la del plomo depositado en los huesos es de 1 año, pudiendo llegar a permanecer durante un período de 30 años (Scheuhammer, 1987). La bioacumulación del plomo en el tejido óseo puede ser una herramienta de gran utilidad para describir la evolución del contenido corporal y exposición al contaminante con el tiempo por el organismo (Drash *et al.*, 1997).

El envenenamiento por plomo (*plumbismo* o saturnismo) en aves se debe principalmente a la ingestión de perdigones como resultado de los hábitos de caza en zonas delimitadas, cotos de caza o tiro deportivo (Readig *et al.*, 1980; Pattee & Hennes, 1983; Mateo *et al.*, 1998; Clark & Scheuhammer, 2003; Pain *et al.*, 2005). Las intoxicaciones agudas (exposición a una alta concentración durante un corto periodo de tiempo) pueden causar la muerte (Ramo *et al.*, 1992; Mateo *et al.*, 1998), mientras que la exposición crónica (exposición prolongada a concentraciones menores) puede tener efectos subletales muy diversos, afectando al éxito reproductor (Buerger *et al.*, 1986), respuesta inmune (Redig *et al.*, 1991; Rocke & Samuel, 1991; Grasman & Scanlon 1995) o fisiología de los organismos expuestos (Buerger, 1995; Buerger & Gochfeld, 1996; Mateo *et al.*, 1997; Fair & Ricklefs, 2002), entre otros. Los perdigones de plomo se ingieren posiblemente como ayuda a la digestión mecánica en la molleja del ave y estómago donde terminan disolviéndose y pasando a la sangre. En aves de rapiña, como en el caso del alimoche, este envenenamiento por plomo

también puede estar causado por la ingesta de perdigones embebidos en piezas de caza no cobradas (Scheuhammer & Norris, 1996). En aves esta toxicidad asociada al plomo depende fundamentalmente del efecto combinado de dos factores: la particular conformación de su sistema digestivo y la elevada facilidad con que las aves silvestres pueden hallar e ingerir objetos de plomo, y en particular, perdigones, resto de la actividad cinegética. Con respecto al primer factor, el estómago de las aves está dividido en dos grandes partes: el estómago glandular (proventrículo), en donde se produce HCl y enzimas para la digestión de alimentos, y el estómago muscular (ventrículo) en el que muchas especies almacenan guijarros (gastrolitos) con las que muelen los alimentos (Suarez & Urios, 1999). La toxicidad del plomo dependerá principalmente de cinco factores principales: disponibilidad, dosis, frecuencia de ingestión, tiempo de permanencia en el estómago (asociadas a la presencia de plomo), y pH gástrico. El perdigón, plomo metálico, se disolverá a una mayor velocidad en el estómago del ave dependiendo de la acidez del medio, favorecida por el ácido clorhídrico y gástrico, y la acción mecánica de los gastrolitos.

- Mercurio

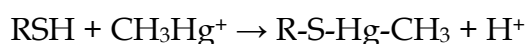
El mercurio es un metal pesado, también denominado *azogue*, que se presenta de forma natural en el ambiente bajo diferentes formas químicas. Al igual que otros metales pesados, como el plomo o el cadmio, el mercurio es un elemento constitutivo de la corteza terrestre (Suzuki *et al.*, 1991). Su forma pura, el mercurio “elemental” o “metálico”, se presenta líquido aunque, y si no está encapsulado, tiende a evaporarse con facilidad a temperatura ambiente (Hites, 2007). Las formas más comunes en la naturaleza son el mercurio en su forma orgánica e inorgánica. Entre los compuestos inorgánicos del mercurio, conocidas como *sales de mercurio*, encontramos: cinabrio (HgS), óxido de mercurio (HgO) y cloruro

de mercurio (HgCl_2). El mercurio orgánico resulta de la combinación de mercurio elemental con carbono y otros elementos, denominados como *compuestos organomercuriales*. Entre estos compuestos orgánicos del mercurio podemos encontrar dimetilmercurio, fenilmercurio o metilmercurio, éste último el más extendido en el ambiente. La mayoría de estos compuestos orgánicos mercuriados aparecen en el ambiente a partir de metabolismos microbianos -procesos bióticos- (Manahan, 1999). La *especiación*, distribución de un determinado elemento entre diversos compuestos químicos, del mercurio determinará en gran medida la toxicidad y exposición en organismos vivos (Landis & Yu, 2000).

La forma en que el mercurio se libera al ambiente variará principalmente según los tipos y fuentes de emisión entre otros factores. La contaminación por mercurio en el ambiente puede ocurrir de forma natural o a partir de fuentes antropogénicas. Entre las fuentes naturales podemos encontrar aquellas producidas por actividad volcánica, erosión de sedimentos continentales de este metal, o emisiones gaseosas provenientes de la corteza terrestre (Landis & Yu, 2000). No obstante, la mayor parte del mercurio en el ambiente procede de fuentes o actividades antropogénicas incluyendo la minería, combustión de combustibles fósiles (el contenido de mercurio en el carbón es de aproximadamente 1 ppm), tratamiento de menas de mercurio, procesado del papel, incineración de residuos, uso de productos mercuriados en agricultura y desechos en hornos de fundición (Hites, 2008). Los compuestos mercuriados son empleados también en la industria para la fabricación de productos clorados para su uso como pesticidas o en la síntesis de PCBs (De Voogt and Brinkman, 1989). La presencia de mercurio es frecuente en lagos y mares (Hites, 2008). La actividad de los microorganismos convierte el mercurio elemental en metilmercurio (MeHg) a través de un proceso denominado *metilación*, permitiendo al mercurio introducirse en

la cadena alimenticia y consecuentemente entrar a formar parte de procesos de *biomagnificación* (Drabæk & Iverfeldt, 1995).

El mercurio y sus compuestos son sumamente tóxicos. De igual manera que ocurre con algunos metales pesados (*v.gr.* plomo o cadmio), los efectos últimos del mercurio en el metabolismo son el daño celular y la inhibición de la actividad enzimática (Petering & Tepper, 1976). Los procesos de inhibición en los que intervienen el mercurio son numerosos (Suzuki *et al.*, 1991). La particular reactividad del mercurio con los ligandos del tipo tiol confirma la afinidad del mercurio para reaccionar con grupos SH, como se muestra en la siguiente reacción para el metilmercurio (Suzuki *et al.*, 1991):



El mercurio puede alterar igualmente el metabolismo de otros elementos como el sodio o el potasio incrementando su permeabilidad (Landis & Yu, 2000). De igual forma, el mercurio puede inhibir el mecanismo de transporte activo de elementos en organismos a través de la disipación del gradiente normal de cationes; destruir aparatos mitocondriales; causar incrementos de tamaño celular provocando la lisis final; provocar la disminución de los niveles de α - y γ -globulina y aumento de β - globulina que a su vez provoca disfunción renal; disminuir los contenidos de ADN en células, y afectar adversamente a cromosomas, dando posible lugar a procesos de mutagénesis (Suzuki *et al.*, 1991).

La toxicidad del mercurio dependerá fundamental de su forma química. Entre los compuestos orgánicos del mercurio destaca el metilmercurio. Este compuesto es un neurotóxico que puede llegar a provocar efectos adversos en el desarrollo del cerebro en seres vivos en formación, al

traspasar fácilmente la barrera placentaria y hematoencefálica (Albert *et al.*, 2003). El metilmercurio puede ser igualmente causante de enfermedades de tipo cardiovascular. Elementos inorgánicos del mercurio, mercurio elemental e incluso algunos compuestos orgánicos del mercurio, como el fenilmercurio, son de similar toxicidad. Todos estos elementos neurotóxicos afectan negativamente a la actividad de glándulas tiroideas y sistema renal, siendo los riñones el punto de destino crítico en lo que a exposición a compuestos inorgánicos se refiere (Suzuki *et al.*, 1991). Debido a su nefrotoxicidad la exposición a elementos y compuestos mercuriados puede inducir una descalcificación y desmantelación de los huesos.

- Policlorobifenilo (PCB)

Los PCBs son una clase de compuestos químicos en los que de 2 a 10 átomos de cloro se unen a una molécula bifenilo. Son compuestos de gran persistencia, liposolubles y fácilmente asimilables por organismos. Los monoclorobifenilos (*v.gr.* un átomo de cloro unido a una molécula bifenilo) son usualmente incluidos cuando se describe el grupo de los PCBs (Mills *et al.*, 2007). La estructura general de los policlorobifenilos se muestra en la figura 1.5. Como puede observarse en la figura 1.5., a partir de la estructura general se pueden sintetizar un extenso número de policlorobifenilos. Las diferentes 209 combinaciones posibles de compuestos son denominados “*congéneres*” (Mills *et al.*, 2007). Los PCBs también pueden ser clasificados por su grado de cloración (Ishikawa *et al.*, 2007). El término “*homólogo*” es empleado para referirse a todos los compuestos organoclorados con el mismo número de cloros en su estructura (*v.gr.* tricloro-bifenilos). Homólogos con diferentes patrones de sustitución son referidos como isómeros. Por ejemplo, el diclorobifenilo homólogo contiene 12 isómeros.

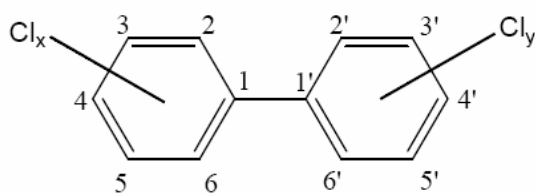


Figura 1.5. Estructura general de policlorobifenilos

Los PCBs se encuentran principalmente en estado sólido o en forma de líquido oleoso y su color varía en diferentes tonalidades amarillentas (Landis & Yu, 2000). *Monsanto Corporation*, el mayor productor de PCBs entre 1930 y 1977, comercializó mezclas de PCBs con el nombre comercial de *Aroclor*, los cuales fueron muy extendidos y frecuentemente empleados en Estados Unidos y Europa. Estos productos comerciales se identifican por un número de cuatro dígitos en el que los dos primeros dígitos indican el tipo de mezcla y los dos últimos dígitos el contenido en cloro, en tanto por ciento en peso (Baird, 1999). Por ejemplo, el nombre *Aroclor 1254* hace referencia a que la mezcla contiene aproximadamente un 54 % de cloro por peso, como indican los dos últimos dígitos de la denominación. La producción de PCBs finalizó en los Estados Unidos a finales de los años 70 debido a la evidencia del daño que producían éstos en el medio ambiente y sus efectos perjudiciales para la salud. Las marcas de otros PCBs comercializados en otros países son: *Chopen* (Alemania), *Fenclor* (Italia), *Kanechlor* (Japón) y *Phenoclor* (Francia) (De Voogt & Brinkman, 1989).

Los PCBs se liberan al ambiente únicamente a través de la actividad humana. No se conocen fuentes naturales de estos productos en la naturaleza. La mayor parte de los PCBs que encontramos en la atmósfera provienen de la volatilización previa de éstos, desde su forma líquida o sólida. Esta presencia de PCBs en la atmósfera puede provenir de

basureros incontrolados o lugares de vertidos tóxicos, incineración de desechos que contengan PCBs, fuga de equipos eléctricos en desuso, o incluso vertidos o derrames ilegales (Murphy *et al.*, 1985; Eisenreich *et al.*, 1992; Blumbach & Nethe, 1996). Debido a su dificultad para arder y su excelente capacidad como material aislante, los PCBs son ampliamente empleados como refrigerantes y lubricantes en transformadores, condensadores y gran variedad de equipos eléctricos de gran tamaño (Baird, 1999).

Los policlorobifenilos (PCBs) pueden causar un buen número de efectos dañinos en la salud (Treon *et al.*, 1956; Seegal *et al.*, 1986; Barron *et al.*, 1995). Los efectos en la salud por la exposición a mezclas de PCB son difíciles de evaluar, ya que la mayoría de la información toxicológica disponible se refiere únicamente a siete tipos de mezclas de PCBs producidos comercialmente. Entre los efectos adversos asociados a la toxicidad de PCBs se han descrito; alteraciones en el sistema inmunológico, cambios en el desarrollo neurológico, carcinogénesis, efectos adversos en sistema hepático y endocrino, piel y ojos, entre otros (Puhvel *et al.*, 1992; Landis & Yu, 2000).

Entre estos efectos 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 tiroideas, (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 tiroides 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 tiroides debidas a la toxicidad de los PCBs altera la formación de tejidos mineralizados que están regulados por estas hormonas.

- 2,3,7,8 - tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD)

El término '*dioxina*' hace referencia a un grupo de éteres aromáticos clorados formados por 75 compuestos policlorados dibenzo-para-dioxinas (PCDDs) y 135 compuestos policlorados dibenzofuranos (PCDFs) (Schiller *et al.*, 1985). Las dioxinas pueden generarse en procesos de blanqueamiento con cloro en la industria del papel, en la cloración de aguas residuales y potables, en la fabricación de algunos pesticidas y en la incineración de residuos sólidos urbanos (WHO-ECEH/IPCS, 2000).

La 2,3,7,8 - tetraclorodibenzo-*p*-dioxina, mencionada comúnmente con la abreviación TCDD, es la dioxina más peligrosa conocida hasta el momento. Su estructura se representa en la Figura 1.5. La TCDD es una sustancia sólida extremadamente lipofílica y con una solubilidad muy baja en agua (0.2 ppb) (Reggiani, 1983). La única fuente de formación de estas dioxinas la constituye la reacción térmica en la síntesis química de 2,4,5 triclorofenol o en la combustión de productos químicos como

clorofenoles, bencenos clorados y bifenil éter. Estas sustancias son comúnmente empleadas en la producción de herbicidas y bactericidas. Una vez introducida en el ambiente es difícilmente transportada teniendo una vida media que oscila entre los 1 y 3 años (Schiller *et al.*, 1985).

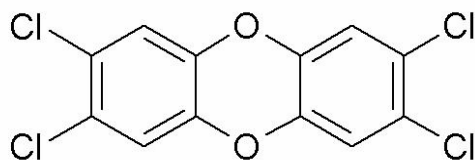


Figura 1.5. Estructura de la 2,3,7,8 - tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD)

En los experimentos toxicológicos realizados sobre animales en laboratorio, la TCDD es capaz de producir efectos teratógenos, siendo especialmente comunes las alteraciones cutáneas y capilares, renales, hendiduras palatales, abortos espontáneos e incluso la muerte (Schiller *et al.*, 1985). También ha demostrado ser un agente cancerígeno en ratas y ratones, aunque en este caso tras someter a los animales a niveles muy elevados del producto durante prolongados períodos de tiempo (WHO-ECEH/IPCS, 2000).

Experimentos realizados con TCDD demuestran como la exposición al mismo producía una potencia tóxica inusual, sugiriendo la posible existencia de un receptor específico para dioxinas. Las dioxinas ejercen sus efectos a través de la unión de alta afinidad con una proteína celular específica conocida como el receptor arilo de hidrocarburo (AhR). 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. La forma activada del receptor AhR también interactúa con otras proteínas reguladoras, como las kinasas celulares específicas, las proteínas de control del ciclo celular, y otras proteínas involucradas en la apoptosis (Puga *et al.*, 2005). 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).

Los mecanismos implicados en la toxicidad inducida del TCDD en el tejido óseo han sido únicamente estudiados en un limitado número de investigaciones *in vitro*. En estos trabajos se describe como los osteoblastos son sobre todo las células más afectadas por dicha toxicidad del TCDD. En concreto, el TCDD interfiere en la diferenciación de estas células pero no en su proliferación (Gierthy *et al.*, 1994). 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). Por otra parte, el resveratrol, un antagonista del AhR, ha mostrado un efecto de inhibición sobre la actividad de osteoblastos mediado por la toxicidad generada por el TCDD (Singh *et al.*, 2000).

1.3. Justificación y objetivos

Existen una gran variedad de organismos capaces de inducir e incluso controlar la precipitación de minerales (Lowestán & Weiner, 1989). Estos biominerales desempeñan un gran número de funciones vitales en organismos que van desde aquellos que sirven como reservorio de nutrientes generados por el organismo, estructuras y/o cubiertas de protección, soporte estructural e incluso precisos dispositivos gravitatorios (Mann, 2001). Uno de los procesos de biomineralización más relevantes es la fabricación de tejidos mineralizados (*v.gr.* huesos, cáscaras de huevo, conchas de moluscos). Aunque en la actualidad se posee gran

cantidad de información acerca de la composición y estructura de los biominerales, y cómo se da la especificidad de unas especies a otras, todavía no se conoce con exactitud los mecanismos concretos de formación y crecimiento de éstos así como su relación con la fase orgánica. El desarrollo de nuevas técnicas y metodologías de caracterización mineral y cristalográfica de estos materiales constituyen herramientas fundamentales para el conocimiento de las interacciones y procesos físico-químicos y biológicos que dan lugar y regulan la formación de estos minerales.

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. Un número limitado de estudios toxicológicos describen como ciertos contaminantes, en particular organoclorados y metales pesados, pueden afectar negativamente los procesos de calcificación de tejidos. Así, el efecto de estos contaminantes en organismos se puede estudiar mediante el análisis de la composición de tejidos mineralizados y su grado de mineralización, siendo estos materiales biogénicos una herramienta idónea y de gran sensibilidad para evaluar la exposición a tóxicos en seres vivos.

En este sentido, el objetivo principal de la tesis se centra en el desarrollo de una metodología y unas herramientas analíticas que permitan la caracterización mineral y cristalina de tejidos mineralizados, en particular el tejido óseo, con el fin de evaluar el impacto de la contaminación, debido a metales pesados y compuestos organoclorados, en organismos así como su utilidad como bioindicadores.

Los objetivos concretos de la tesis presentada se detallan a continuación:

- i)* Cuantificar los efectos tóxicos en organismos a través del análisis de tejidos mineralizados. Evaluación del impacto de la contaminación en las poblaciones expuestas y su relación con el ecosistema.
- ii)* Estudio de los mecanismos de incorporación y acumulación de distintos tipos de contaminantes, metales pesados y compuestos organoclorados, en el tejido óseo para determinar su utilidad como registros de la contaminación.
- iii)* Idoneidad del empleo de tejidos mineralizados, en nuestro caso el tejido óseo, como bioindicador de la contaminación. Para ello se estudiarán tejidos mineralizados de diferentes organismos en zonas contaminadas para evaluar la gravedad de dicha contaminación y sus efectos tóxicos en organismos.
- iv)* Comparación del efecto de contaminantes en animales silvestres por exposición natural y en animales modelo por exposición controlada/inducida en experimentos de laboratorio.
- v)* Estudio de la composición y textura de los biomateriales mediante técnicas analíticas avanzadas. Determinación de parámetros cuantitativos composicionales y texturales del tejido óseo que evalúen el efecto de la contaminación en organismos.
- vi)* Validación de los resultados obtenidos del análisis composicional y textural del tejido óseo con otras de técnicas analíticas complementarias.

- vii)* Estudiar la relación entre los efectos observados mediante las técnicas analíticas anteriores y diferentes tipos de marcadores fisiológicos.

- viii)* Interpretación de los potenciales mecanismos toxicológicos que dan lugar a alteraciones metabólicas en organismos y su relación con una posible modificación en la correcta mineralización del tejido óseo. Estudio de las propiedades de los contaminantes de actuar como disruptores endocrinos y su correlación con los procesos de formación y resorción del tejido óseo.

- ix)* Determinación de las fuentes de contaminación y evaluación de los riesgos para la salud para la población que tiene acceso a los ecosistemas afectados.

2. Material y métodos

2.1. Material

A continuación se detallan las muestras empleadas en los diferentes trabajos que constituyen el trabajo de tesis (índice de manuscritos en página 15)

2.1.2. Muestras empleadas

Manuscrito I

Este estudio se realizó en una región localizada en la península de Brunswick (Georgia, EEUU). En dicha localidad existe una zona de marismas altamente contaminada con PCB (policlorobifenilo)- *Aroclor 1268* - y mercurio. En el ambiente de marisma se estudiaron dos localizaciones: (1) una zona con altos niveles de contaminación "*Superfund site*" (*Linden Chemicals and Plastics; LCP*) y (2) otra zona de referencia "*Blythe Island*", localizada aproximadamente a unos 5 Km de la anterior y con condiciones ambientales análogas a dicha zona (*v. gr.* vegetación, influencia de mareas, diversidad poblacional), en la que no se constató una destacada presencia de contaminantes. En ambas zonas se recogieron un buen número de huevos de gallinuela de manglar (*Rallus longirostris*). Estos huevos fueron posteriormente incubados hasta el nacimiento de los polluelos en las dependencias del Savannah River Ecology Laboratory, Georgia, EEUU (la descripción detallada de las condiciones en incubadora y nacedora se describen en el manuscrito). Se emplearon 40 muestras de hueso (fémur, tibia y fibula) de 20 individuos seleccionados en cada una de las zonas estudiadas.

Manuscrito II

Para este estudio se emplearon 39 muestras de hueso de alimoche (*Neophron percnopterus*). Veintiocho de estas aves procedían de las Islas Canarias, mientras que las once restantes procedían de diferentes puntos de la Península Ibérica (Cádiz, Navarra y Ronda). Los ejemplares se recogieron como cadáveres, en centros de recuperación de fauna silvestre, entre los años 1999 y 2004, por los servicios veterinarios de administraciones autonómicas y locales españolas. Tras su traslado y conservación temporal en el Departamento de Biología Aplicada de la Estación Biológica de Doñana se extrajo de cada individuo el húmero de la extremidad, izquierda o derecha indistintamente, mediante disección. Una vez extraído el hueso se procedió a cortar secciones de aproximadamente 2 cm de longitud de la diáfisis del hueso. Las muestras obtenidas se lavaron repetidamente en agua destilada para eliminar posibles restos de la disección y corte.

Manuscrito III

La parte experimental de este estudio se desarrolló en el Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia). Para éste se emplearon 20 ratas del tipo *Sprague-Dawley*. Las ratas se mantuvieron separadas bajo condiciones estándar (50% humedad, 22°C, ciclo de 12 horas luz/oscuridad). A los dos meses de edad, alcanzado las ratas un peso aproximado de 200g, se les trató con TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina) a través de una inyección intraperitoneal de 50 µg/kg (N=10) o solución vehículo, aceite vegetal (N=9). Cinco días después de la exposición las ratas se sacrificaron y mediante disección se extrajo la tibia de ambas extremidades para su posterior análisis.

Manuscrito IV

En este trabajo se emplearon 20 ratas del tipo Sprague-Dawley, material previamente empleado en diferentes publicaciones (Lind *et al.*, 1999; Lind *et al.*, 2000; Lind *et al.*, 2004). La mitad de éstas fue expuesta mediante inyección intraperitoneal a concentraciones de PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Andover, MA) de 64 µg/kg en los días 14, 22, 36, 48, 56 y 68 posteriores a su nacimiento (dosis total 384 µg/kg). El resto de las ratas (grupo control) fueron inyectadas de la misma forma con solución vehículo (aceite vegetal; Sigma Chemical, St Louis, MO). Las ratas se sacrificaron a los seis meses de edad y se procedió a la disección de las vértebras para su posterior análisis.

Manuscrito V

Para este trabajo se utilizaron 40 ejemplares de perdiz roja (*Alectoris rufa*) abatidas en el comienzo de la temporada cinegética, a finales del mes de octubre, de los años 2004 y 2006 en la provincia de Albacete (centro-sureste de España). Para el estudio descrito se emplearon los fémures extraídos de las aves mediante disección. Una vez extraídas las muestras óseas se procedió a la sección de pequeños fragmentos de la diáfisis de los huesos. Posteriormente, los fragmentos obtenidos fueron lavados repetidamente en agua destilada con el objetivo de eliminar posibles restos de la anterior disección y corte.

2.1.2. Preparación de las muestras óseas

Tras su disección y/o corte las muestras de hueso se lavaron repetidamente en agua destilada para eliminar cualquier posible resto de tejidos o contaminación y se *criomolieron* (CertiPrep 6750 Freezer/Mill, SPEX) para su posterior análisis. La preparación en polvo de las muestras

facilitó en gran medida la digestión de éstas para su análisis químico, mediante TG, AAS, ICP e IRMS, para la preparación de las pastillas destinadas a los análisis de espectrometría de infrarrojo y la homogeneización de la muestra para la obtención de los patrones de difracción de Rayos X.

2.2. Técnicas analíticas empleadas

A continuación describiremos brevemente cada una de las técnicas analíticas empleadas y el método de tratamiento de datos de los espectros y diagramas obtenidos. Se hace especial énfasis en la obtención de variables cuantitativas para la caracterización de la composición mineral y química de las muestras óseas a partir de los espectros de FTIR.

2.2.1. Espectrometría de Absorción Atómica (EAA) / Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)

La Espectrometría de Absorción Atómica (EAA) se emplea para determinar la composición de elementos inorgánicos en una muestra. La EAA se basa en el principio de atomizar la muestra y la posterior cuantificación de la concentración de átomos que aparecen en la fase gaseosa midiendo la intensidad de luz absorbida en determinadas longitudes de onda (Broekaert, 2002). Un aspecto fundamental en la EAA es el método empleado para atomizar la muestra a analizar, ya que éste determinará la sensibilidad de la medida de la técnica. Entre los diferentes métodos utilizados se incluyen el de llama, grafito, electro-térmico, horno de plasma y atomización hidro-vapor (Watson, 2007). Normalmente, el procedimiento emplea llama para transformar las soluciones a analizar en átomos gaseosos. La EAA se utiliza comúnmente para análisis cuantitativos de metales en matrices complejas; el límite de detección, en condiciones favorables, es del orden de algunas decenas de partes por

billón. No obstante este límite podrá variar según la naturaleza del analito y de la matriz o del tipo de instrumentación empleada.

2.2.2. Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (E-PAI) / Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS)

La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo es una técnica de análisis inorgánico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de 8 órdenes de magnitud (ng/l - mg/l) (Gross, 2004). Su principal característica es que posee unos límites de detección, para la mayoría de los elementos, de unas pocas ppb-ppt, que la hace ideal para el análisis de elementos traza. La muestra líquida es vaporizada e ionizada gracias a un plasma de Argón. Los iones una vez formados pasan al espectrómetro de masas, donde son separados mediante un analizador y detectados como una corriente eléctrica (Hoffmann, 1999). Es por lo tanto una técnica idónea para el análisis de aguas, alimentos, lixiviados de rocas y minerales, etc (Gross, 2004). Además, desde los últimos años, el uso de un LASER de ablación, acoplado al ICP-MS, permite el análisis de elementos trazas y tierras raras en minerales, fósiles, metales, semiconductores, etc, en un área de muestra de tan solo 50 μm (Watson, 2007). La técnica de ICP-MS combina dos propiedades analíticas que la convierten en un potente instrumento en el campo del análisis de trazas multielemental. Por una parte, obtiene una matriz libre de interferencias debido a la eficiencia de ionización del plasma de Argón y por otra parte presenta una alta relación señal-ruido característica en las técnicas de espectrometría de masas (Watson, 2007). El plasma de acoplamiento inductivo de argón se usa como una fuente muy eficaz de iones en su estado M^+ . El espectro de masas de esta fuente de iones es medido a través de un espectrometro de masas cuadrupolar. Esto es posible

mediante una zona de interfase capaz de introducir los iones del plasma a través de un orificio (Cono) por medio de una unidad de vacío diferencial dentro del filtro de masas cuadrupolar (*Skimmer*) (Gross, 2007).

2.2.3. Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) / Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES)

Esta técnica se basa en un método atómico de emisión con plasma acoplado. La ICP-OES constituye una de las técnicas más empleadas para la determinación de vestigios metálicos en muestras. Se basa, como en el caso anterior, en la medida de la radiación emitida por una muestra previamente excitada. Los plasma acoplados inductivamente constituyen la fuente de excitación y la medición se realiza a través de la espectrometría de emisión óptica (OES). En el caso del ICP-OES los iones generados emiten radiación a la longitud de onda característica de cada uno de los elementos presentes en la muestra, la cual es transmitida del sistema óptico al detector, donde la imagen capturada se convierte a señales de intensidad para cada elemento y, consecuentemente, a sus concentraciones en la muestra (Watson, 2007). Se trata de una técnica adecuada para concentraciones mayoritarias (%) o partes por millón (ppm).

En la tabla 2.1. se describen los elementos analizados en cada muestra ósea, las especies de muestras empleadas en cada caso, tejido analizado, modelo de espectrómetro empleado, localización del equipo y manuscrito en el que aparecen reflejados los resultados de cada análisis.

Tabla 2.1. Descripción de los análisis de elementos traza realizados mediante AAS, ICP-MS, ICP-OES, elementos analizados en cada muestra, tejido analizado en cada caso, especie de la que se extrajeron las muestras, modelo de espectrómetro empleado, localización del equipo, y manuscrito en el que aparecen reflejados los resultados de cada análisis.

Técnica	Elementos	Tejido	Muestras	Modelo	Localización	Manuscrito
ICP-MS	Ca, P	Hueso (fémur, tibia y fíbula)	Gallinuela de manglar (<i>Rallus longirostris</i>)	Perkin Elmer Elan 6000	Savannah River Ecology Laboratory The University of Georgia, EEUU	I
AAS	Pb	Hueso (húmero)	Alimoche (<i>Neophron percnopterus</i>)	Perkin Elmer mod.5100	Centro Instrumentación Científica (Universidad de Granada)	II
ICP-OES	Ca, P	Hueso (tibia)	Ratas <i>Sprague-Dawley</i>	Mod. ARL 3410, Fisons	Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS) Universidad de Sevilla	III
AAS	Pb	Hueso (fémur)	Perdices (<i>Alectoris rufa</i>)	Perkin-Elmer mod. 5100	Centro Instrumentación Científica (Universidad de Granada)	V

2.2.4. Espectrometría de Masas de Razones Isotópicas (IRMS) / Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)

En los isótopos estables, las diferencias de masa son lo suficientemente grandes como para que las características físicas y químicas de las moléculas que los contienen sean ligeramente diferentes. En la naturaleza tienen lugar un gran número de procesos fisicoquímicos que determinan la forma en que los isótopos se reparten entre diferentes sustancias o entre diferentes fases de una misma sustancia, a esto se le denomina fraccionamiento isotópico (Hoefs, 1997). Como resultado de estos procesos de fraccionamiento nos encontramos con sustancias que difieren ligeramente en la distribución de los isótopos estables y por tanto en su masa, diferencias que pueden medirse mediante la Espectrometría de Masas de Razones Isotópicas (IRMS, en sus siglas inglesas) (Groot, 2004).

El análisis de los isótopos estables se realiza en forma de moléculas gaseosas del tipo H₂, CO₂, N₂ o SO₂ que son introducidas en el espectrómetro de masas. La composición isotópica se obtiene al comparar la razón de las intensidades de los haces iónicos del haz de la muestra con la misma razón de un gas de referencia o patrón interno (Groot, 2004).

El espectrómetro de masas consta de una fuente de ionización por impacto electrónico, un tubo de vuelo con analizador magnético y un sistema de colector de iones. Las principales peculiaridades de los IRMS con respecto a los convencionales espectrómetros de masas consisten básicamente en que no se emplean para análisis cualitativo, no requieren prácticamente resolución de masas, requieren ultra-vacío, el electroimán no debe fluctuar y el sistema de detección es de tipo multicolector (una copa de Faraday para cada haz de iones) (Hoefs, 1997).

Para los análisis de razones isotópicas de carbono carbon (¹³C/¹²C) y nitrógeno (¹⁵N/¹⁴N) se empleó una analizador tipo NA2500 acoplado a un espectrómetro de masas (IRMS; Finnigan Delta + XL), localizado en el Savannah River Ecology Laboratory (University of Georgia, EEUU). Como estándar para los análisis isotópicos se empleó Dorm-2 (National Research Council of Canada). La composición isotópica de las muestras se expresó en notación delta (δ) (Kelly, 2000).

2.2.5. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) / Transmission Electron Microscopy (TEM)

En un microscopio electrónico de transmisión (TEM) la muestra es iluminada por un haz paralelo y coherente de electrones. Una parte de los electrones lanzados sobre la muestra se transmite sin sufrir dispersión y otra parte es transmitida experimentando dispersión elástica e inelástica.

La imagen generada en el TEM se produce cuando un haz de electrones, condensado a través de una serie de lentes electromagnéticas, se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío. El conjunto de electrones que atraviesan la muestra delgada son proyectados sobre una pantalla fluorescente formando una imagen visible o igualmente sobre una placa fotográfica registrando una imagen latente, de forma que se puede evaluar detalladamente la estructura de la muestra proporcionando imágenes de hasta del orden de cientos de miles de aumentos.

Por otra parte, con este microscopio se puede obtener el patrón de difracción de electrones de la muestra, lo que nos aporta una valiosa información sobre la estructura cristalina de la misma. Esto es posible al hacer incidir un haz de electrones sobre un cristal de la muestra con un ángulo capaz de satisfacer la ley de Bragg para una determinada distancia entre planos atómicos d_{hkl} . Ya que la longitud de onda de los electrones es muy pequeña esta condición se satisface para muchos planos de una misma zona cristalográfica. El diagrama de difracción está formado por los puntos de corte de los haces difractados con el plano de la pantalla. Estos patrones de difracción de electrones representan, por tanto, la sección de la red recíproca del cristal en el plano normal al haz de electrones (Cullity, 1978; Williams & Carter, 1996).

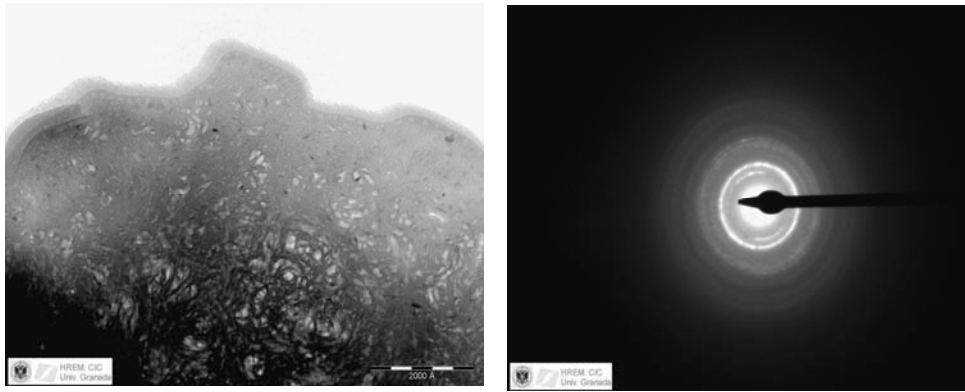


Figura 2.1. (izq.) Imagen TEM de una sección de hueso procedente del cuerpo vertebral de una vértebra de rata del tipo Sprague-Dawley. (dcha.) Patrón de difracción de electrones adquirido de una sección de hueso de vértebra de rata del tipo Sprague-Dawley.

2.2.6. Espectroscopia Infrarroja (IR) / Infrared Spectroscopy (IR)

La espectroscopia infrarroja estudia la interacción entre la materia y la radiación infrarroja, radiación que corresponde a la región del espectro electromagnético que abarca las longitudes de onda entre 0,7 y 1.000 μm . La radiación IR fue descubierta en 1800 por William Herschel, Astrónomo Real de la Corte de Inglaterra (Chalmers & Griffiths, 2002). En un intento por determinar la energía correspondiente a las diferentes áreas del espectro visible, Herschel empleó un prisma para dispersar la luz solar y observó el aumento de temperatura que cada color producía en un conjunto de termómetros de mercurio, que en el año 1800 constituía la tecnología más sofisticada para la medida de la temperatura, demostrando la existencia de una forma de luz invisible más allá del color rojo (Herschel, 1800).

La espectroscopia IR es sensible a la presencia de grupos funcionales en una molécula, es decir, fragmentos estructurales con unas propiedades químicas comunes (un metileno, $-\text{CH}_2-$, en un hidrocarburo, un carbonilo, $\text{C}=\text{O}$, en una cetona, o un hidroxilo, $-\text{OH}$, en un alcohol, son ejemplos de grupos funcionales). La característica principal de la espectroscopia IR es que permite identificar especies químicas a través de la determinación de la frecuencia a la que los distintos grupos funcionales presentan bandas de absorción en el espectro IR (Chalmers & Griffiths, 2002). Mediante la comparación de los espectros de IR de dos muestras se puede determinar si ambas tienen o no la misma composición.

Esta espectroscopia representa importantes ventajas como técnica analítica. Permite analizar todo tipo de muestras sólidas, líquidas o gaseosas. Es una técnica sencilla y rápida (en muchos casos, se puede preparar la muestra, registrar el espectro y representarlo en pocos minutos) y de una alta sensibilidad. Además, los espectrómetros de IR son relativamente baratos. Entre sus desventajas, la principal es que para una muestra presente un espectro IR debe de poseer enlaces químicos. Por lo tanto, los átomos y los iones monoatómicos no absorben radiación IR. Tampoco pueden detectarse las moléculas biatómicas homonucleares, como O_2 o N_2 . También presenta limitaciones para el análisis de mezclas complejas y de disoluciones acuosas (ya que el agua absorbe fuertemente la radiación infrarroja).

El espectro infrarrojo consiste en una representación gráfica de la intensidad de la radiación infrarroja medida en función del número de ondas. En el eje de abscisas se representa la longitud de onda, habitualmente en el intervalo $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ (IR medio) y en orden decreciente, es decir, en la lectura del espectro de izquierda a derecha, se hace un barrido de mayor a menor energía de la radiación infrarroja. En el

eje de ordenadas se representa, generalmente, absorbancia o transmitancia.

La transmitancia (T) se define como la relación entre la intensidad de radiación que emerge de la muestras (I) y la que ésta recibe (I_0). Lo habitual es representar la transmitancia porcentual (%T):

$$T = I/I_0$$

$$\% T = 100 T$$

El parámetro I contiene información de la muestra, pero también contribuciones del espectrómetro y el ambiente. Estas dos contribuciones son las que mide I_0 , que se denomina espectro de fondo (*background*). Por tanto, al calcular la relación entre I e I_0 , es decir, la transmitancia, las contribuciones del equipo y del ambiente se eliminan.

Para el análisis cuantitativo, el espectro debe representarse en unidades de absorbancia (A), que se calcula como el logaritmo decimal de la inversa de la transmitancia:

$$A = \log (1/T) = \log (I_0/I)$$

Espectrómetros con transformada de Fourier

El desarrollo de la espectroscopía FTIR tuvo su inicio en la invención por Michelson, en 1891, del interferómetro de doble haz, en el que se basan la mayoría de los interferómetros usados en la actualidad en espectroscopia IR (Ford & Spragg, 1986). El interferómetro de Michelson (ver figura 2.2) es un dispositivo en el que se divide un haz de radiación en dos haces que, tras recorrer caminos de distinta longitud, son de nuevo recombinados. De esta forma, se crea una interferencia del haz que

emerge en función de la diferencia de camino recorrido por los haces separados (Michelson, 1891).

El interferómetro consiste en dos espejos planos perpendiculares entre sí, uno de los cuales puede moverse en dirección perpendicular a su superficie, a una velocidad constante. Entre los dos espejos se sitúa un separador (*beamsplitter*) donde parte de la radiación que llega de la fuente se refleja hacia uno de los espejos y parte se transmite hacia el otro espejo. Después de que los haces vuelven al separador, interfieren y, de nuevo, una parte se transmite y la otra se refleja. Debido al fenómeno de interferencia, la intensidad del haz que llega al detector varía con la diferencia de camino que recorre los haces de radiación en las dos ramas del interferómetro. Este patrón de interferencia se denomina interferograma y contiene la información espectral en un espectrómetro FT.

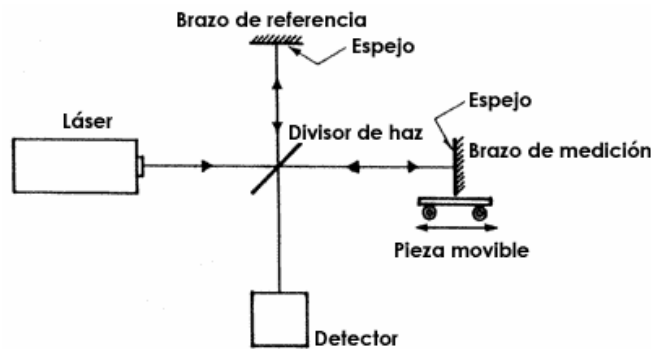


Figura 2.2. Interferómetro de Michelson.

El método de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier presenta importantes ventajas con respecto a los espectrómetros dispersivos, que han hecho que, junto con la popularización de los ordenadores, los espectrómetros FTIR hayan sustituido en la actualidad de forma prácticamente total a los equipos dispersivos. La principal de

estas ventajas es que, para un mismo tiempo de adquisición, el interferómetro genera un espectro con una relación señal/ruido muy superior, o de forma equivalente, el interferómetro permite adquirir un espectro en un tiempo mucho más corto que un equipo dispersivo, para una misma relación señal/ruido. Esta mejora en la relación señal/ruido se debe a que en un espectrómetro FTIR el interferómetro recibe simultáneamente todas las longitudes de onda del espectro, mientras que en un equipo dispersivo, cada punto del espectro se va registrando sucesivamente. Por otra parte, Pierre Jacquinot señaló que en los espectrómetros FTIR la intensidad del haz puede ser mayor que en un equipo dispersivo (ventaja de Jacquinot), lo que también contribuye a mejorar la relación señal/ruido (Clarke *et al.*, 2002). La ventaja de Jacquinot se deriva de la mayor apertura que presenta el interferómetro en comparación con la apertura de las rendijas de un monocromador. Otra ventaja que presenta la espectroscopia FTIR es su mayor precisión en la longitud de onda. Una transformación precisa del interferograma en espectro requiere que los puntos del interferograma sean registrados a intervalos de retraso exactamente iguales. Además de estas ventajas, los espectrómetros FTIR, a diferencia de los equipos dispersivos, proporcionan una resolución constante en todo el espectro, no presentan los efectos de polarización de la luz que son típicos de las redes de difracción, ni tampoco producen saltos en la línea base como los producidos por los cambios bruscos en la apertura de las rendijas de un monocromador (Griffiths & De Haseth, 2007).

La preparación de la muestra suele ser la parte más tediosa y larga de un experimento de espectroscopia infrarroja. La calidad del espectro dependerá generalmente del grado de perfección que se haya alcanzado en la preparación de la muestra. Las muestras sólidas son las más complicadas de preparar porque las partículas sólidas reflejan y dispersan

la radiación incidente, y por tanto la transmitancia es baja. De esta forma la preparación de las muestras en pastillas con KBr o KCl, aplicándole presión, ayuda a reducir la dispersión de la radiación infrarroja.

En espectroscopia de IR se cumple la conocida regla de Lambert-Beer, que relaciona la intensidad de la banda con la concentración de la muestra medida.

$$A = -\log T(\nu) = a(\nu)bc$$

donde A es la absorbancia, $T(\nu)$ y $a(\nu)$ son la transmitancia y el coeficiente de absorción a un valor de frecuencia dado, b es la longitud de paso óptico y c es la concentración de la muestra. El coeficiente de absorción es propio de cada modo vibracional y depende de la variación del momento bipolar de la molécula durante la vibración. De la regla de Lambert-Beer se deduce que la intensidad de la banda (absorbancia) medida en el infrarrojo varía linealmente con la concentración de la muestra, y por tanto es posible realizar análisis cuantitativos por espectroscopia infrarroja (Chalmers & Griffiths, 2002).

Preparación de las muestras para el análisis FTIR

Para los análisis de espectrometría infrarroja se mezclaron y homogeneizaron 5 mg de muestra de hueso en polvo y 90 mg de KBr. La preparación en forma de pastillas se obtuvo bajo presión de 10 Tn métricas durante 10 minutos. Los espectros se recogieron en modo absorbancia, entre las frecuencias 400 y 4000 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1} y un total de 128 barridos por muestra (3730 puntos de muestreo). Una pastilla de referencia con composición constante (95 mg de BrK) se utilizó para corregir el fondo (*background*) de los espectros obtenidos de las muestras de hueso.

Equipos FTIR empleados

Los espectros de infrarrojo se registraron empleando varios modelos de espectrómetros de FTIR (a la izquierda se detalla la localización del equipo utilizado):

<i>Magna IR-860 Nicolet</i>	<i>Savannah River Ecology Laboratory The University of Georgia, EEUU</i>
<i>Magna IR-200 Nicolet</i>	<i>Departamento de Química Inorgánica Universidad de Granada, España</i>
<i>20 SXB Nicolet</i>	<i>Centro de Instrumentación Científica Universidad de Granada, España</i>

Análisis espectral

Las diferentes cantidades de fosfato, carbonato, colágeno y lípidos en las muestras de hueso analizadas se determinaron mediante el cálculo del área de los picos de las bandas de absorción asociadas a enlaces de grupos carbonato, fosfato, amida y C-H alifático del espectro de infrarrojo (ver figura 2.3.). La integración y cálculo de las áreas se realizó con la ayuda del paquete informático EZ-OMNIC® y PeakFIT®. La deconvolución de los picos que presentaban solapamiento entre áreas se resolvió mediante el cálculo de la segunda derivada de las funciones. Este método permite un mejor y más detallado análisis cuantitativo del espectro de FTIR.

Para la determinación gráfica de las áreas de los picos solapados se realizó un ajuste a través de una función mixta *Lorentziana-Gaussiana* ($r < 0.9997$) y variando el tipo de suavizado según la banda del espectro analizada. Los análisis realizados permiten variar la amplitud y forma de las funciones gráficas obtenidas en cada pico. En todos los casos se sustrajo el fondo del espectro a través de una recta ajustada a los valores extremos en cada banda.

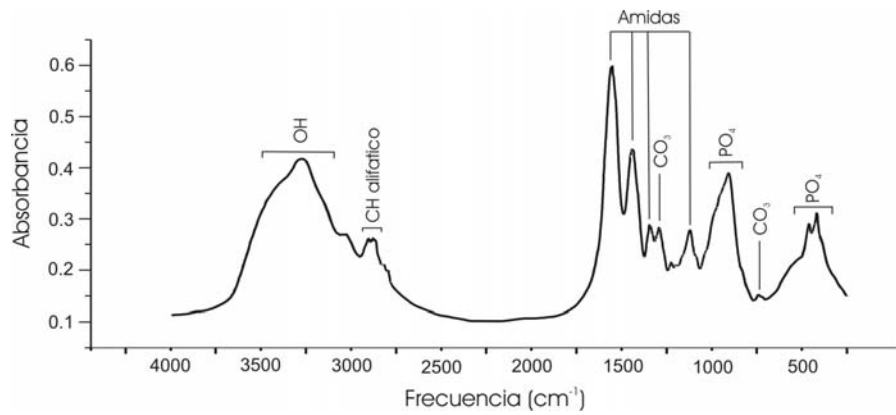


Figura 2.3. Espectro FTIR obtenido para las muestras de hueso.

A continuación describiremos en detalle las diferentes bandas utilizadas en los análisis de los espectros de IR:

Banda 500-650 cm^{-1} ν_4 PO_4

El espectro FTIR del hueso en la banda correspondiente a ν_4 PO_4 muestra tres picos de absorción independientes de la matriz orgánica; dos picos de baja intensidad entre 530-540 cm^{-1} y 570-580 cm^{-1} que corresponden a HPO_4^{2-} y una tercera banda de absorción a 603 cm^{-1} , no relacionada con iones HPO_4^{2-} o OH^- , que correspondería a PO_4^{3-} inestable (Rey *et al.*, 1990). Existe otra banda a 560 cm^{-1} cuya intensidad está correlacionada con la banda anterior a 603 cm^{-1} . El ión HPO_4^{3-} distorsiona la señal del espectro correspondiente al ión PO_4^{3-} no obstante la vibración de tensión de la banda P-OH (dominio ν_3) aparece a una frecuencia menor de 870 cm^{-1} que en apatito biológico aparece oculta por una fuerte banda del ν_2 CO_3^{2-} (Miller *et al.*, 2001). La vibración de tensión PO-H también da una banda ancha entre las frecuencias 2.400-2500 cm^{-1} que no se detecta en apatito biológico (Rey *et al.*, 1990).

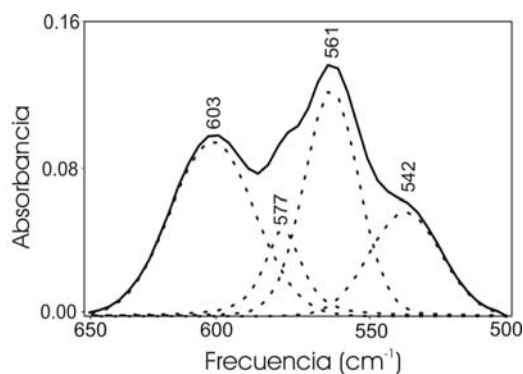


Figura 2.4. Banda 500-650 cm^{-1} $\nu_4 \text{PO}_4$

Banda 850-890 cm^{-1} $\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$

En el hueso el dominio más importante de frecuencias de vibración de CO_3^{2-} (entre 1400-1600 cm^{-1} , dominio ν_3) está solapado por numerosas bandas de absorción de proteínas (CH, Amida II, COO-) o glicosaminoglicanos (NH) (Rey *et al.*, 1991). La banda de carbonatos en el dominio $\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$ presenta tres componentes: un pico principal localizado a 872 cm^{-1} correspondiente a iones carbonato localizados en los sitios de PO_4^{3-} (carbonato tipo B - sitio aniónico trivalente-), un pico a 880 cm^{-1} asignado a iones carbonatos substituyendo a iones OH^- en la estructura del apatito (carbonato tipo A - sitio aniónico monovalente-) y una banda a 865 cm^{-1} que correspondería a carbonato lábil inestable (Rey *et al.*, 1989). En nuestro caso hemos centrado el estudio en el modo CO_3^{2-} tipo B (sustitución PO_4^{3-}) del espectro infrarrojo por su mayor intensidad de señal media en el espectro de IR y su conveniencia para la deconvolución de las subbandas.

Banda 900-1200 cm^{-1} $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$

El dominio $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ de los iones ortofosfato en el espectro de IR consiste en una intensa banda de absorción generalmente dividida en dos componentes principales a 1170-1085 cm^{-1} y 1085-970 cm^{-1} (Rey *et al.*, 1991). En depósitos minerales jóvenes de apatito biológico encontramos

bandas a 1027, 1078, 1104, 1125 cm^{-1} pertenecientes a hidroxiapatito esteoquímico poco cristalizado. Las bandas a 1027 y 1078 cm^{-1} parecen darse en apatito no esteoquímico conteniendo iones HPO_4^{2-} (Rey *et al.*, 1991). Aunque las bandas a 1104 y 1124 cm^{-1} no se han encontrado en ningún apatito bien cristalizado éstas están presentes en apatito precipitado recientemente. Estas últimas bandas desaparecen progresivamente durante la maduración biológica del hueso.

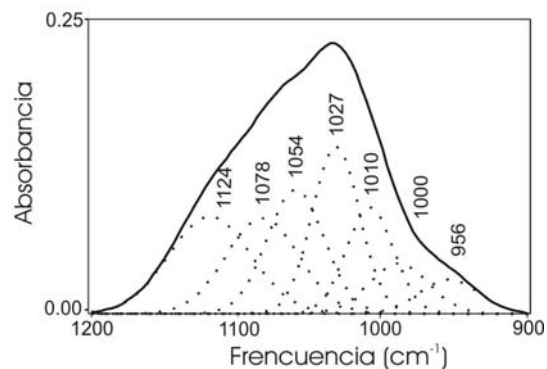


Figura 2.5. Banda 900-1200 cm^{-1} v_3 PO_4^{3-}

Banda 1350-1950 cm^{-1}

En esta banda encontramos los modos de vibración de la materia orgánica en el hueso. Entre las frecuencias de la banda encontramos la banda de amida I (C-O modo distorsión a una frecuencia aproximada de 1660 cm^{-1}), el modo distorsión y deformación de los grupos CH_2 y CH_3 entre las frecuencias 1350-1450 cm^{-1} , el modo C-O distorsión asociado a grupos carboxilo a 1420 cm^{-1} y la banda de amida III a 1270 cm^{-1} (no analizada en el estudio de la banda) (Bohic *et al.*, 2000). Existe, una relación con la frecuencia 872 cm^{-1} de la banda v_2 CO_3^{2-} (850-890 cm^{-1}), con el área del pico a 1403 cm^{-1} de esta banda que corresponde igualmente a ión CO_3^{2-} tipo B (sustitución PO_4^{3-}) (Ou-Yang *et al.*, 2001).

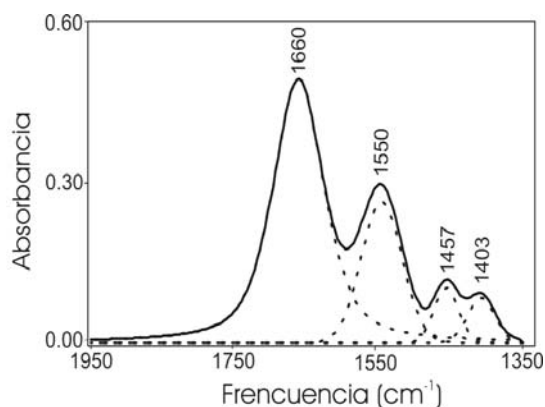


Figura 2.6. Banda 1350-1950 cm^{-1}

La tabla 2.2. resume la asignación aproximada de picos y bandas realizada para cada región o grupos moleculares que podrá variar dependiendo del tipo de muestra y ajuste utilizados. La información de la tabla se ha obtenido a partir de las siguientes referencias bibliográficas: Rey *et al.* (1989); El Feki *et al.* (1991); Rey *et al.* (1991); Paschalis *et al.* (1996); Boskey (1999); Bohic *et al.* (2000); Miller *et al.* (2001). En el caso de los grupos moleculares que generan más de una banda de absorción solamente hemos tenido en cuenta aquellos picos correspondientes a la banda de mayor intensidad. En concreto, se han utilizado los picos de la banda de fosfato a 900-1200 cm^{-1} en lugar de la banda a 500-650 cm^{-1} por su conveniencia a la hora de realizar la deconvolución del espectro.

Con el fin de minimizar el efecto de los diferentes tamaños de muestra analizados en el espectro IR, las áreas de las regiones y picos aislados se normalizaron al área de la banda 3800-2800 cm^{-1} , asociada con los grupos OH. Las razones de las áreas resultantes son representadas con una "A" seguido por la posición de la banda o pico (*v.gr.* A1403, A900-1200, A850-890). Los picos obtenidos a partir de la deconvolución de la banda se normalizaron al ancho del área de la banda, estos picos los representamos

con una "a" precedida de la posición del pico (v.gr. a865, a872, a1000, a1027, a1054).

Tabla 2.2. Asignación de regiones/grupos moleculares.

Región cm⁻¹	Grupos moleculares
A500-650	<i>v</i> ₄ PO ₄
a527	HPO ₄ ⁻²
a540	HPO ₄ ⁻²
a560	PO ₄ ⁻³
a603	PO ₄ ⁻³
A850-890	<i>v</i> ₂ CO ₃ ⁻²
a865	Carbonato inestable
a872	CO ₃ ⁻² tipo B (sustitución PO ₄ ⁻³)
a880	CO ₃ ⁻² tipo A (sustitución OH ⁻)
A900-1200	<i>v</i> ₃ PO ₄ ⁻³
a956	HPO ₄ ⁻²
a1000	Apatito poco cristalino
a1010	Apatito poco cristalino
a1027	Apatito altamente cristalino
a1054	Apatito altamente cristalino
a1078	Apatito cristalino
a1124	Apatito poco cristalino
A1350-1950	Grupos amidas y carbonatos
A1403	CO ₃ ⁻² tipo B (sustitución PO ₄ ⁻³)
a1457	CH ₂
a1550	Amida II
A1660	Amida I
A2800-3800	OH "tensión-deformación"

A partir de las bandas y picos localizados y descritos en el espectro de IR definiremos los siguientes índices para describir la composición mineral del hueso:

El grado de mineralización del hueso se definió como la razón entre el fosfato mineral del hueso y materia orgánica (colágeno):

$$\text{Grado de mineralización (\%)} = A_{900-1200} / A_{1660}$$

donde $A_{900-1200}$ corresponde al área de la banda $900-1200 \text{ cm}^{-1}$ - $\nu_3 \text{ PO}_4^{3-}$ - relacionada con la cantidad de fosfato mineral en el hueso y A_{1660} , correspondiente a la banda a 1660 cm^{-1} , área relacionada con amida tipo I (Boskey & Mendelsohn, 2005).

La cantidad de carbonato mineral (CO_3min), principalmente de sustitución tipo B, (Boskey, 1999) se calculó como la razón entre el área del pico correspondiente a 1405 cm^{-1} , dividida por el área asignada anteriormente a la cantidad de fosfato ($A_{900-1200}$):

$$\text{CO}_3\text{min} = A_{1405} / A_{900-1200}$$

El Índice de Cristalinidad (CI) se calculó como la razón entre las áreas de los picos a 1030 cm^{-1} (apatito altamente cristalino) y 1010 cm^{-1} (apatito pobremente cristalino), (Miller *et al.*, 2001).

$$CI = a_{1030} / a_{1010}$$

Se han estudiando otras correlaciones entre diferentes regiones del espectro. Cada una de estas variables corresponden a grupos moleculares relacionados con la composición química del hueso. Se determinaron los siguientes índices:

- referidos a fosfatos

$$\text{Fosfato total} = A_{900-1200}$$

$$\text{PO}_4\text{cris} = a_{1027} + a_{1054} + a_{1078} + a_{1104}$$

$$\text{Fosfato cristalino (\%)} = \text{PO}_4\text{cris} / \text{Fosfato total}$$

- referidos a carbonatos

$$\text{Carbonato total} = A_{850-890}$$

$$\text{Carbonato amorfo (\%)} = a_{865} / \text{Carbonato total}$$

$$\text{Carbonato cristalino (\%)} = (a_{872} + a_{880}) / \text{Carbonato total}$$

- referido a materia orgánica

$$\text{Lípidos (\%)} = A_{2800-3000} / (A_{2800-3000} + \text{Colágeno})$$

2.3. Validación del método de deconvolución del espectro FTIR

Con el objetivo de estudiar la validez del método de deconvolución del espectro de FTIR y la asignación de las variables con diferentes características composicionales del tejido óseo se compararon estos resultados con los obtenidos mediante difracción de rayos X y termogravimetría.

2.3.1. Difracción de Rayos X

La técnica de difracción de rayos X permite la identificación de las fases cristalinas presentes a partir del patrón de difracción que produce la red de cada fase al ser irradiada mediante un haz de rayos X. Cuando un haz

monocromático de rayos X incide sobre una muestra, además de la absorción y otros fenómenos, se produce una dispersión de rayos X que mantiene la misma longitud de onda que el haz incidente. Esta *dispersión de rayos X coherente* no está distribuida uniformemente en el espacio, sino que es función de la distribución de densidad electrónica de la muestra. Si esa muestra es cristalina, es decir tiene sus átomos y moléculas ordenados periódicamente, la intensidad y la distribución espacial de los rayos X dispersados forma un patrón de difracción específico relacionado con la estructura interna del material. Los rayos X se difractan según los planos que constituyen la red de un cristal siguiendo la ley de Bragg: $n \lambda = n d \sen \theta$, que relaciona la longitud de onda de los rayos X (λ), el espaciado entre los planos (d) y el ángulo de difracción correspondiente (θ), ver figura 2.7. Además se ha de cumplir otra condición relacionada con la posición relativa de los planos cristalográficos y los haces incidentes y reflejados: la normal a los planos (hkl) ha de ser paralela a la bisectriz entre el haz incidente y el reflejado. Conociendo los ángulos de difracción y la longitud de onda, se determinan las distancias interplanares (d_{hkl}) características del material.

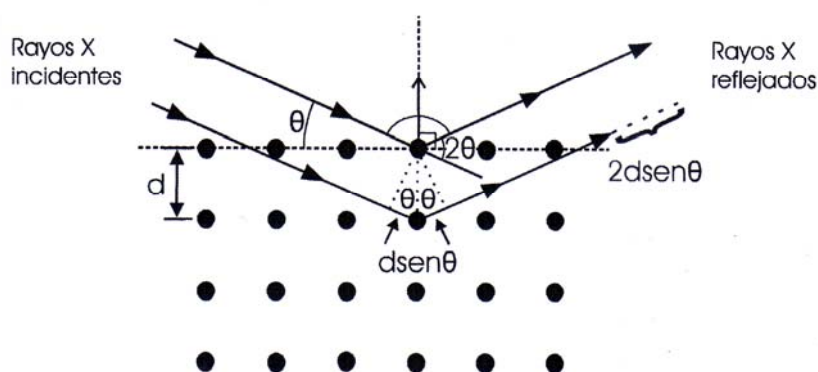


Figura 2.7. Ley de Bragg. Representación de la condición necesaria para la difracción de rayos X.

Para la determinación de la fase mineral y su cristalinidad mediante difracción de rayos X se utilizó un difractómetro Philips PW1710 de rendija automática con radiación Cu-K α (Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada). Para ello se utilizaron las condiciones instrumentales que se describen en la tabla 2.3. Se empleó una muestra estándar de apatito de alta cristalinidad, ver figura 2.8 (apatito del lago Bear, Ontario, Canada; The Mineralogical Society of Pennsylvania). Para las muestras de hueso en polvo analizadas se obtuvieron diagramas de difracción de Rayos X como el mostrado en la figura 2.9.

Tabla 2.3. Condiciones experimentales para los experimentos de difracción de rayos X.

Radiación	Cu K α
Filtro	Ni
Voltaje de aceleración	40 KV
Corriente del filamento	40 mA
Espectro explorado	20° < 2 θ < 45°
Velocidad de exploración	0.05° (2 θ) / s
Tiempo de integración	1 s
Tiempo aproximado de exploración	7-8 min

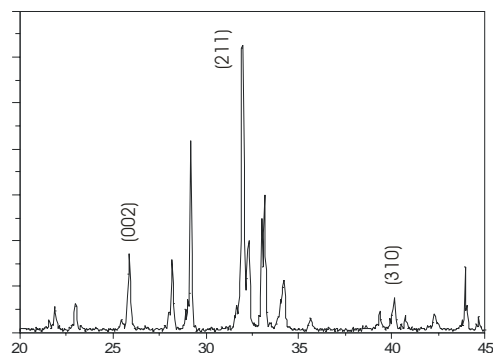


Figura 2.8. Diagrama de Rayos X de la muestra de referencia

Tabla 2.4. Localización de las reflexiones.

Reflexiones	(002)	(211)	(310)
Localización (2θ)	~25.85	~31.85	~39.70

Para la interpretación de los diagramas de rayos X se estudiaron las reflexiones (002), (211) y (310) de los diagramas obtenidos del apatito (ver tabla 2.4 y figura 2.9). La determinación de la medida del tamaño medio del cristalito se obtuvo a partir de la fórmula de Scherrer, que relaciona el tamaño medio t de los cristalitos con la anchura media de las líneas de difracción. La expresión incluye una constante K que varía de 0.89 a 1.39, en nuestro caso hemos empleado un valor constante de 0.9.

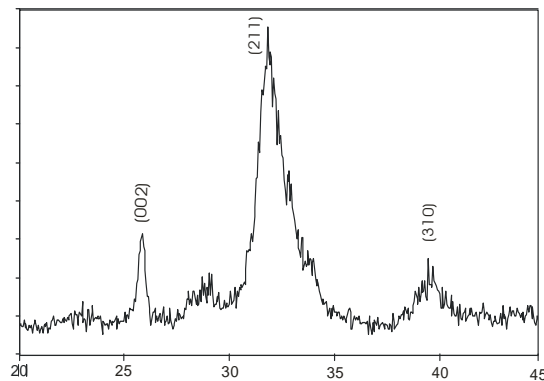


Figura 2.9. Diagrama de Rayos X obtenido de una muestra en polvo.

La fórmula de Scherrer se expresa como:

$$t = K \cdot \lambda / B \cos \theta_B$$

donde:

$$\lambda = CuK\alpha = 1.5418$$

$$B = \frac{1}{2} (2\theta_1 - 2\theta_2) = \theta_1 - \theta_2$$

$$B_{calculada} = [(B_{media} - B_{instr.}) * [B^2_{media} - B^2_{instr.}]^{1/2}]^2$$

Para estudiar la validez de la variable Índice de Cristalinidad (CI), obtenida a partir de los datos de FTIR, comparamos estos valores con los determinados para la medida del tamaño medio del cristalito para la

reflexión (002), por ser éste el pico de difracción mejor definido en el patrón de difracción. Se emplearon 20 muestras procedentes del estudio realizado con los algunos de los ejemplares de alimoche descritos en el Manuscrito II, obteniendo una significativa correlación positiva entre ambas variables (r Pearson = 0.528; p = 0.008; N = 20).

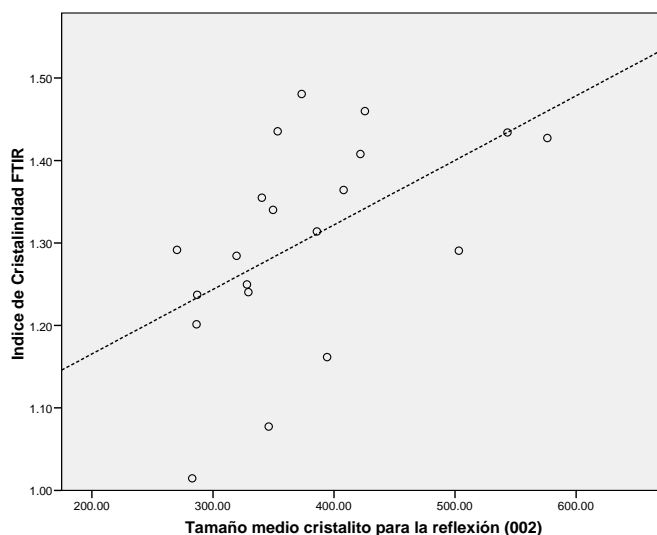


Figura 2.10. Relación entre las variables obtenida mediante FTIR, Índice de Cristalinidad - CI -, y el tamaño medio del cristalito para la reflexión (002) de la muestras de hueso (ajuste lineal $r = 0.579$).

2.3.2. Termogravimetría

La termogravimetría (TG) está basada en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando se la somete a un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. Esta variación puede ser una pérdida o una ganancia de masa.

Para los análisis de termogravimetría se empleó un equipo termogravimétrico Shimadzu TGA-50H equipado con una microbalanza Mettler-Toledo AX26 Delta Range pertenecientes al Centro de

Instrumentación Científica (Universidad de Granada). Dependiendo del rango de temperatura donde ocurre una pérdida de peso en la muestra ésta se asigna a diferentes componentes del hueso: agua (0-100 °C), colágeno (100-400 °C), carbonato (600-800 °C).

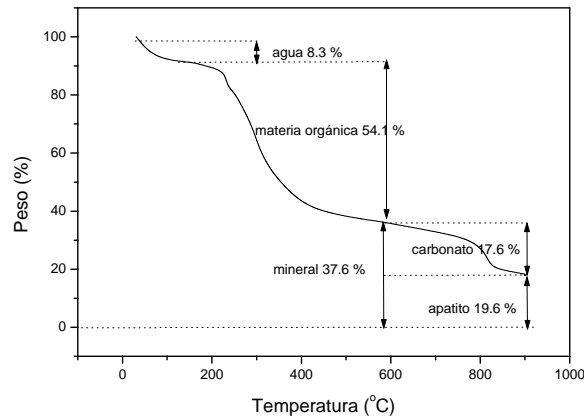


Figura 2.11. Identificación de la composición mineral del hueso obtenida a partir de análisis termogravimétrico.

La composición del mineral del hueso se estudió a partir del análisis termogravimétrico de 10 de las muestras de alimoche (Manuscrito II). Se compararon las variables obtenidas a partir de TG y FTIR correspondientes al contenido mineral y en carbonatos del hueso. En el caso de las variables CO_3min (variable obtenida mediante FTIR) y carbonato (mediante TG) la correlación entre ambas fue positiva y muy significativa (r Pearson = 0.883; $p > 0.001$; $N = 10$), ver figura 2.12.

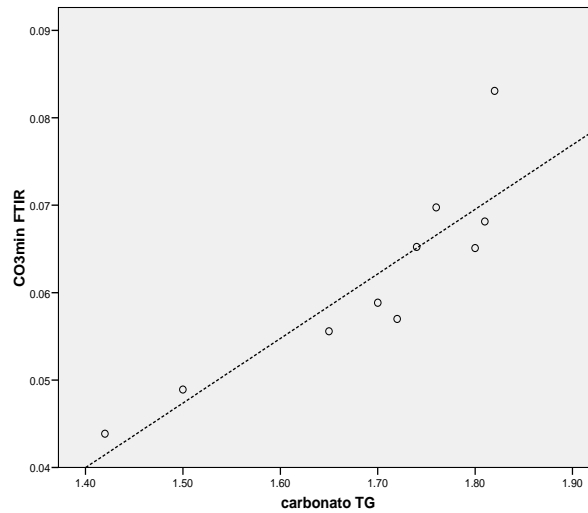


Figura 2.12. Relación entre las variables obtenidas mediante TG y FTIR para determinar el contenido en carbonato del hueso (ajuste lineal, $r = 0.779$).

La correlación entre las variables grado de mineralización (variable obtenida mediante FTIR) y mineral (obtenida mediante TG) fue también positiva y muy significativa (r Pearson = 0.627; $p = 0.017$; $N=10$), ver figura 2.13.

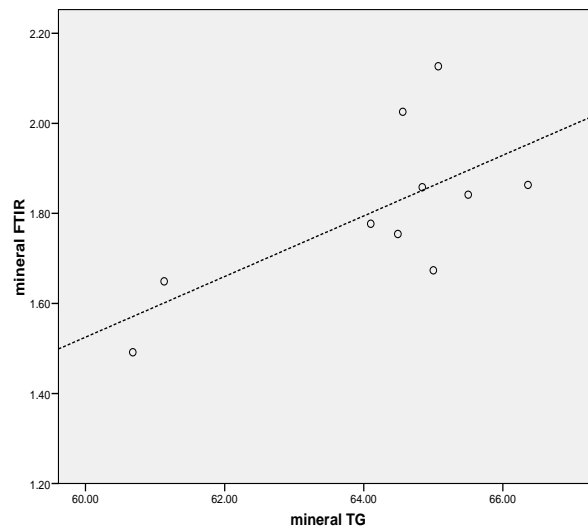


Figura 2.13. Relación entre las variables obtenidas mediante TG y FTIR para determinar el grado de mineralización del hueso (ajuste lineal, $r = 0.451$).

2.4. Análisis estadísticos y paquetes informáticos empleados

En el estudio de las relaciones entre parámetros y variables se han usado análisis de correlación de Pearson, modelos de correlación bivariada y parcial, y modelos de regresión lineal. Para todos los análisis estadísticos se emplearon los paquetes informáticos SPSS (SPSS Inc.) y ORIGIN® (OriginLab Corporation). Los gráficos representados en la memoria de tesis y la presentación de los manuscritos se obtuvieron a partir de los paquetes informáticos; ORIGIN® (OriginLab Corporation), CorelDRAW© y Adobe Photoshop®.

El tratamiento de datos y espectros obtenidos en las diferentes técnicas analíticas empleadas se realizó empleando los siguientes paquetes informáticos: EZ-OMNIC® (Thermo Fisher Scientific, Inc), PeakFIT® (Systat Software Inc.), ImageTool (National Institutes of Health, Bethesda, MD), XRD2DScan y X Powder.

3. Resultados y discusión

A continuación se describen los resultados de mayor interés y una breve discusión de los manuscritos que constituyen la memoria de tesis (ver índice de manuscritos en página 15):

Manuscrito I. Efecto la exposición in ovo a PCBs y Hg en la composición química del mineral del hueso en una población de gallinuela de manglar de una zona contaminada de marismas en las costas de Georgia, EEUU.

Manuscript I. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on Clapper Rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia.

La exposición a contaminantes (*v.gr.* metales pesados y compuestos organoclorados) puede causar defectos, malformaciones óseas y alterar la correcta mineralización del tejido óseo tanto en especies salvajes como en animales modelo en laboratorio (Baxley *et al.*, 1981; Scheuhammer, 1987; Andrews, 1989; Kanti & Smith, 1997; Lind *et al.*, 1999). En este trabajo se estudia el efecto producido por la exposición a Hg y PCB (*Aroclor 1268*) en dos poblaciones de gallinuela de manglar (*Rallus longirostris*) localizadas en una zona de marismas altamente contaminada de la península de Brunswick (Georgia, EEUU). En particular para evaluar el daño producido por estos tóxicos se estudiaron posibles alteraciones en el tejido óseo de estas aves.

Los análisis de las muestras de huesos recolectadas para este estudio, demuestran que la exposición a ambos tipos de contaminantes no afectó al tamaño y peso de los huesos de las extremidades de los ejemplares de gallinuela analizadas. No obstante, la composición química del tejido se

vio significativamente alterada. Específicamente, los huesos de la zona contaminada ("LCP site") mostraron un valor mayor en la razón Ca/P , así como un menor contenido de carbonato y fosfato ácido (ácido fosfórico) en comparación con las muestras procedentes de la zona de referencia ("Blythe Island"). La composición de los huesos de los individuos procedentes de la zona contaminada presenta características de composición de mayor madurez de la que correspondería a aves recién nacidas. Asimismo, los datos obtenidos a través de FTIR revelan una correlación significativa entre las dosis de contaminantes analizadas en el hueso y su cristalinidad, así como una relación con las áreas relativas de los modos vibracionales específicos de los grupos fosfatos en la banda ν_3 PO_4^{3-} . Estas variaciones composicionales son características de una mayor madurez ósea y están posiblemente relacionadas con una alteración hormonal del metabolismo que provoca una alteración (reducción) de la tasa de remodelación del hueso por la exposición a estos contaminantes. En principio, las correlaciones observadas entre las concentraciones de PCB en hueso y sus efectos en la composición química apuntan a que este tóxico en concreto es el causante de las alteraciones observadas en el tejido óseo. Aun así, no se puede descartar la posibilidad de que pueda existir un efecto cooperativo con el Hg, o incluso con otros contaminantes posiblemente presentes en el medio a menores concentraciones (Kannan *et al.*, 1997; Kannan *et al.*, 1998).

En conclusión, estos resultados indican como las muestras de huesos analizadas de aquellos ejemplares provenientes de la zona contaminada presentan una mayor maduración ósea comparada con los ejemplares de la zona de referencia. Esto puede deberse a una reducción de la tasa de remodelación del tejido óseo causada por una alteración del metabolismo del hueso, relacionada con la exposición a PCB (Aroclor 1268), actuando como disruptor endocrino. Por último, la novedosa metodología

empleada en este trabajo para determinar las posibles variaciones en la composición química mineral del hueso puede servir para medir cuantitativamente el impacto causado por la toxicidad de contaminantes en poblaciones de otros ecosistemas afectados por la contaminación. Asimismo, este trabajo demuestra la gran utilidad y potencial de la técnica de FTIR para estudiar las alteraciones del tejido óseo. Esta técnica resulta idónea para el estudio de materiales tan complejos como el hueso, compuesto por una parte mineral nanocristalina y otra orgánica.

Manuscrito II. Alteración de la mineralización ósea debida a la intoxicación por plomo en alimoche (Neophron percnopterus).

Manuscript II. Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources.

La ingestión de perdigones y fragmentos de munición es actualmente una de las principales fuentes de envenenamiento por plomo en vertebrados, fundamentalmente aves (Grinnell, 1894; Bellrose, 1959). En el caso de rapaces, la ingestión de perdigones embebidos en piezas de caza no cobradas constituye la principal vía de incorporación de plomo en el organismo. Los efectos subletales debidos a la intoxicación por plomo son de muy diversa naturaleza, y en contadas ocasiones se han descrito en poblaciones silvestres. En este trabajo se estudian en detalle los efectos de la intoxicación por plomo a través del análisis de sangre y tejido óseo en dos poblaciones de alimoche (*Neophron percnopterus*), una población insular sedentaria y una segunda población continental migratoria, expuestas ambas a distinto grado de exposición a este contaminante.

Los análisis de plomo en el tejido óseo mostraron una mayor concentración del metal en la población insular, que aumenta con la edad de los individuos, poniendo de manifiesto la existencia de una ingestión

crónica. Esta acumulación alteró significativamente el grado de mineralización del tejido óseo, determinado mediante espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), siendo éste menor en aquellos individuos con mayores concentraciones de plomo determinadas en hueso. Otra evidencia que apoya la existencia de alteraciones metabólicas del tejido óseo en los alimoches canarios son los altos niveles de fosfatasa alcalina en suero (ALP), que es un marcador bioquímico de la formación y remodelación ósea (Gangoso *et al.*, inédito). Tanto los niveles altos en ALP sérico como un incremento de la tasa de remodelación ósea están claramente asociados con una rápida pérdida de masa ósea y, consecuentemente, en un aumento del riesgo de fractura (Ross & Knowlton, 1998, Ross *et al.*, 2000).

Estos resultados muestran como una población de vertebrados de vida prolongada, en este caso un ave carroñera, que esté expuesta a la ingestión de plomo procedente de la actividad cinegética puede verse afectada a largo plazo por la bioacumulación del metal pesado en el tejido óseo. Las consecuencias últimas de la intoxicación por plomo pueden ser fácilmente subestimadas, ya que sus efectos subletales son difícilmente detectables y se pueden manifestar a muy largo plazo y en combinación con otros muchos factores (Franson *et al.*, 1983; Buerger *et al.*, 1986; Roche & Samuel, 1991; Mateo *et al.*, 1997). En particular, es razonable esperar que los efectos directos en el hueso aumentan la probabilidad de que se produzcan fracturas, lo cual afectaría en último lugar a la supervivencia individual. Asimismo, esta intoxicación puede afectar indirectamente sobre el comportamiento, la capacidad de respuesta inmune y/o el éxito reproductor de las poblaciones expuestas.

Manuscrito III. Daño producido en el tejido óseo debido a la exposición a dioxinas en un corto período de tiempo en ratas del tipo Sprague-Dawley.

Manuscript III. Short-term exposure to dioxin impairs bone tissue in male rats.

Las dioxinas son unos tóxicos de gran potencia que pueden provocar un amplio espectro de efectos tóxicos en animales, incluyendo fracaso reproductivo y cancerogénesis (WHO-ECEH/IPCS, 2000). Asimismo, se ha descrito como la exposición a dioxinas, incluso a pequeñas dosis, afecta al desarrollo de huesos y dientes (Miettinen *et al.*, 2005; Alaluusua & Lukinmaa, 2006), así como producir variaciones en el tamaño y composición del hueso a mayores dosis (Lind *et al.*, 1999; Jämsä *et al.*, 2001; Lind *et al.*, 2004). Los mecanismos implicados en la toxicidad inducida por el TCDD en el tejido óseo sólo se han estudiado en un número limitado de investigaciones en laboratorio. En estos trabajos se describe como el TCDD interfiere en la diferenciación de osteoblastos pero no en su proliferación (Gierthy *et al.*, 1994). Este manuscrito constituye la primera aproximación dirigida a estudiar los efectos de una única exposición a TCDD en la composición y mineralización del hueso en una población de ratas del tipo Sprague-Dawley.

Los análisis de las muestras de huesos indican que el tratamiento con TCDD no modificó significativamente el grado de mineralización del tejido óseo. Sin embargo, sí se observaron alteraciones a nivel molecular mediante FTIR. Específicamente, el mineral del hueso en la población expuesta a TCDD mostró una menor concentración relativa de fosfato ácido (HPO_4) y una mayor concentración de fosfato cristalino en comparación con la población control. Esta alteración en la composición química mineral del hueso puede deberse a una reducción de la actividad

metabólica inducida por la exposición al TCDD. Estos resultados, obtenidos a través del análisis de los espectros de FTIR, están correlacionados con parámetros indicadores de densidad ósea, obtenidos mediante pQCT, que reflejaron una reducción del área del hueso metabólicamente más activo (*v. gr.* hueso trabecular), así como una disminución en los niveles de formación ósea, inferidos a través de los análisis de los niveles del biomarcador PINP sérico.

En conjunto, estos resultados muestran como la exposición incluso a una única dosis de TCCD ($50 \mu\text{g}/\text{Kg}$) y tras un período muy corto de tiempo (5 días desde la exposición) resulta suficiente para manifestar alteraciones notables en el tejido óseo de ratas del tipo Sprague-Dawley. Los efectos producidos por el TCDD en marcadores de formación ósea, así como en la composición química mineral del hueso, muestran la rápida influencia de la toxicidad inducida por dioxinas en los procesos de remodelación ósea.

Manuscrito IV. Efectos de la exposición a 3,3',4,4',5 - pentaclorobifenilo (PCB126) en la composición del mineral del tejido óseo vertebral y en los niveles de tiroxina y vitamina D en ratas Sprague-Dawley.

Manuscript IV. Effects of 3,3',4,4', 5 - pentachlorobiphenyl (PCB126) on vertebral bone mineralization and on thyroxin and vitamin D levels in Sprague-Dawley rats.

Los procesos de remodelación ósea dependen de una variedad de factores de crecimiento y estado hormonal del organismo y que en conjunto regulan la homeostasis del tejido óseo (Boskey, 2007). Estudios recientes han puesto de manifiesto como la exposición a compuestos organoclorados puede alterar el metabolismo y desarrollo normal de

organismos, al actuar éstos como disruptores endocrinos (Brouwer, 1991; Cheek *et al.*, 1999; McNabb & Fox, 2001; Tabuchi *et al.*, 2006). De igual forma, esta disrupción del sistema endocrino, provocada por la toxicidad de PCBs, puede llegar a afectar a los procesos normales de formación, mineralización y remodelación del tejido óseo (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2006; Ramajayam *et al.*, 2007). Con este manuscrito se pretende continuar una serie de trabajos dirigidos a estudiar la alteración provocada por la exposición a PCB126 en el tejido óseo (Lind *et al.*, 1999; 2000; 2004). En concreto, se estudia cómo afecta la exposición a PCB126 (dosis total, 384 µg / kg) en la mineralización del tejido óseo y, en particular, a la composición química mineral y cristalina de vértebras de ratas Sprague-Dawley. Adicionalmente, se estudiaron los efectos que produce dicha exposición a PCB126 sobre los niveles de vitamina D y tiroxina (TT4 y FT4) sérica, indicadores de los procesos de formación del tejido óseo.

Los resultados obtenidos mediante FTIR muestran un menor grado de mineralización del tejido óseo de las vértebras de los individuos expuestos a PCB126. Este efecto negativo en la mineralización ósea puede explicarse como una alteración del proceso normal de remodelación del hueso debida a la exposición al compuesto organoclorado. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios, en los que se observó un efecto catabólico en la mineralización del hueso, producido por la exposición a PCBs (Lind *et al.*, 2000; 2004; Ramajayam *et al.*, 2007). En concreto, estos otros estudios describen un aumento en la actividad de osteoclastos y una disminución en la de osteoblastos (Ramajayam *et al.*, 2007). En este sentido, la exposición a PCB126 puede inducir un efecto de estrés oxidativo que afecta a la remodelación y crecimiento del tejido óseo. Por otra parte, el empleo de las imágenes y patrones de difracción de electrones obtenidos mediante TEM de las muestras de individuos expuestos confirman que existe una menor densidad de cristales de

apatito y de menor cristalinidad, en las secciones de tejido cortical de las vértebras, en individuos expuestos a este tóxico comparado con aquellos individuos del grupo control. Estos resultados de microscopia electrónica están de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente mediante FTIR.

Adicionalmente, los análisis de los niveles de vitamina D y tiroxina mostraron como esta alteración de la mineralización ósea de las vértebras, está directamente relacionada con una reducción de las concentraciones de estas hormonas séricas. Estos receptores hormonales regulan la actividad de osteoblastos y, consecuentemente, median en los procesos de resorción del hueso interfiriendo o favoreciendo la actividad de osteoclastos (Ross, 1998). Esta disminución en las concentraciones de tiroxina puede explicar un descenso del grado de mineralización del tejido óseo, en los individuos expuestos a PCB126, debido a un incremento en la tasa de remodelación del hueso, al ser la tasa de resorción mayor que la de formación. Asimismo, el descenso de vitamina D sérico reduciendo la capacidad del organismo de asimilar calcio, lo cual explica también una menor mineralización del tejido óseo de los individuos afectados por la exposición a PCB126.

En resumen, este trabajo, junto con los resultados de anteriores investigaciones (Lind *et al.*, 1999; 2000; 2004), apoya la hipótesis de que la alteración producida por la exposición a PCB126 afecta negativamente a los procesos de formación y remodelación ósea. Asimismo, este trabajo demuestra como el uso de técnicas analíticas complementarias (FTIR y TEM) permite la caracterización en detalle de posibles alteraciones en la composición mineral y cristalina del tejido óseo. Estos análisis resultan de gran utilidad para la interpretación de los posibles efectos en el tejido óseo de un desajuste hormonal debido a la exposición a contaminantes.

Manuscrito V. Efectos de la ingestión de perdigones de plomo en la mineralización del hueso en una población de perdiz roja (Alectoris rufa)

Manuscript V. Effect of lead-shot ingestion on bone mineralogy in a population of red-legged partridge (Alectoris rufa)

Los metales pesados y, en particular, el plomo, pueden afectar a la correcta mineralización del hueso (Hamilton & O'Flaherty, 1995; Gruber *et al.*, 1997), alterando directa o indirectamente la tasa de remodelación ósea, al modificar el metabolismo del calcio así como la actividad de osteoblastos y osteocitos (Puzas *et al.*, 1992; Kanti & Smith, 1997; Berglund *et al.*, 2000). Asimismo, pueden desempeñar un importante papel como agente en la etiología de enfermedades óseas como la osteoporosis (Puzas, 2000; Bjora *et al.*, 2001). En este trabajo se estudia el efecto de la intoxicación por plomo a través del análisis del hueso mediante técnicas analíticas complementarias (AAS, FTIR, IRMS) en una población de perdiz roja (*Alectoris Rufa*).

Las perdices empleadas para este estudio se encontraban expuestas al plomo de perdigones provenientes de la intensa actividad cinegética de la zona donde habitan (finca Orán, Albacete). Los análisis de FTIR y AAS de las muestras analizadas en este estudio muestran como la acumulación de plomo en el hueso alteró significativamente el grado de mineralización del tejido óseo, disminuyendo éste cuanto mayor era la concentración de plomo determinada en el hueso. Asimismo, los resultados obtenidos mediante IRMS muestran una significativa correlación entre los valores de $\delta^{13}\text{C}$ con las concentraciones de plomo medida en el tejido óseo. La composición isotópica en los diferentes tejidos de un organismo está directamente relacionada con su dieta (DeNiro and Epstein, 1978; Tieszen *et al.*, 1983; Lajtha and Michener, 1994). De esta forma, los individuos que

muestran mayores concentraciones de plomo en hueso posiblemente se alimenten preferencialmente en localizaciones específicas donde se desarrolla una mayor actividad cinegética y, consecuentemente, se acumula una cantidad mayor de perdigones . La diferente distribución de vegetación, de ciclo fotosintético C3 (Calvin) o C4 (Hatch-Slack), asociada a estas zonas de mayor acumulación de perdigones, determinará la disponibilidad de alimento y, en consecuencia, la probabilidad de ingestión de plomo por los individuos que frecuenten estos lugares (Ferrandis *et al.*, 2008). Una razón isotópica de carbono mayor en los alimentos de la zona de mayor actividad cinegética explicaría la correlación existente entre $\delta^{13}\text{C}$ y las concentraciones de plomo determinadas en el hueso.

Estos resultados muestran como la exposición, debida a la acumulación de plomo proveniente de perdigones de caza, puede provocar una alteración del grado de mineralización del hueso en una población de perdiz roja como fruto de una intoxicación por ingestión de plomo. Asimismo, se ha puesto de manifiesto la relación existente entre las zonas de mayor actividad cinegética y el tipo y disponibilidad de alimento sobre la frecuencia o grado de exposición de las perdices a la contaminación por plomo.

4. Conclusiones

Entre las conclusiones de carácter general y de mayor interés derivadas del trabajo descrito en los manuscritos podemos destacar:

1. Los tejidos mineralizados constituyen un registro de gran utilidad para el estudio de la exposición temporal de organismos a contaminantes. Estos tejidos, como es el caso del tejido óseo, pueden llegar incluso a acumular buena parte del tóxico (*v.gr.* plomo) al que se han visto expuesto. El análisis del hueso resulta idóneo para el estudio y seguimiento de los efectos producidos por la exposición a tóxicos, al manifestar cambios composicionales y/o estructurales muy definidos como respuesta a la acción de dichos contaminantes en el organismo.

2. La metodología descrita para la caracterización del tejido óseo puede ser empleada para describir las alteraciones y respuestas metabólicas del tejido relacionadas con la exposición a tóxicos, tanto en especies silvestres como en ensayos de toxicidad realizados en especies modelo en laboratorio. En nuestro caso, se estudiaron los efectos de la exposición al plomo en dos especies de aves silvestres, alimoche y perdiz roja, así como la exposición a PCB y mercurio en otra especie de ave, gallinuela de manglar. De igual forma se aplicó la metodología descrita en ensayos de toxicidad inducida de PCB y TCDD en laboratorio en ratas del tipo Sprague-Dawley.

3. Debido a las características especiales del tejido óseo, formado por una parte mineral nanocristalina y otra orgánica, técnicas analíticas como la DRX y ICP-MS nos proporcionan una información limitada sobre la composición de la parte orgánica y las características cristalinas del

mineral. La espectrometría de IR ha sido la técnica de mayor utilidad e interés de entre las técnicas analíticas empleadas. A partir del análisis detallado de los espectros de FTIR obtenemos una información muy completa de la composición química del hueso a nivel molecular, tanto de la parte orgánica como de la mineral del tejido óseo. El análisis de las diferentes bandas que componen el espectro de FTIR resulta una herramienta muy útil y sensible para cuantificar los cambios composicionales y estructurales del tejido mineralizado. Hasta ahora la mayoría de las investigaciones que han empleado FTIR se centran únicamente en un análisis descriptivo del espectro o una comparación gráfica cualitativa entre espectros. La elección del método de deconvolución, ajuste y determinación de parámetros cuantitativos de los espectros de FTIR, así como su aplicación a los casos de estudio analizados en los diferentes manuscritos presentados, ha sido sin duda una de las partes de mayor interés del trabajo.

4. La utilización del tejido óseo para estudiar los efectos directos e indirectos de la contaminación es de gran interés. La posibilidad de cuantificar los efectos producidos por la exposición a contaminantes, mediante el análisis composicional del hueso resulta una herramienta idónea para el estudio del impacto de dichos tóxicos en un ecosistema. Asimismo, el análisis químico y microestructural del tejido óseo nos ayuda a entender en qué grado y mediante qué mecanismos se ve afectado el metabolismo del organismo por la presencia de contaminantes en el ambiente.

5. El estudio de la composición química y estructural de los tejidos mineralizados nos puede ayudar a interpretar la información obtenida mediante diferentes parámetros bioquímicos, modificados por la existencia de una posible toxicidad. En los trabajos presentados, la

información obtenida a través de diferentes marcadores bioquímicos ha complementado y apoyado la información obtenida mediante el análisis mineral del tejido óseo.

6. Los resultados obtenidos para las especies expuestas a contaminación por plomo muestran una significativa desmineralización del hueso y una alteración de la composición química mineral del hueso. La difusión en el medio de plomo originado por actividades humanas, principalmente de carácter cinegético, ha dado origen a afecciones de diferente naturaleza en el tejido óseo de los organismos expuestos. Mediante el uso de la espectrometría FTIR se ha observado un grado de mineralización ósea menor en aquellos organismos expuestos a mayores niveles de plomo en este tejido lo cual puede producir una mayor incidencia de fracturas que disminuyan la posibilidad de supervivencia.

7. La exposición a PCBs altera de forma significativa la formación de tejidos mineralizados. Estos contaminantes organoclorados actúan como disruptores endocrinos, produciendo una alteración del metabolismo del organismo expuesto y afectando a la correcta mineralización del tejido óseo. En particular, estos tóxicos afectaron a las concentraciones de hormonas segregadas y eliminadas por las glándulas tiroideas, lo cual se refleja en una alteración de la formación de tejidos mineralizados cuyo proceso de mineralización está directamente regulado por estas hormonas. Estas alteraciones se manifiestan en una diferencia significativa en la composición química mineral del hueso en los organismos expuestos a estos productos clorados.

8. La metodología y resultados descritos en los manuscritos constituyen herramientas de gran utilidad para la conservación animal y la planificación de estrategias de conservación global de la fauna

amenazada por determinados tóxicos. De igual forma, establecen instrumentos idóneos para la evaluación de los riesgos para la salud en la población debidos a la exposición a tóxicos a través del acceso a los ecosistemas afectados.

Conclusions

Among the conclusions of higher interest arising from the work described in the manuscripts we can highlight:

1. Mineralized tissues constitute a very useful record studying the exposure to contaminants in organisms. These tissues, such as bone tissue, have the capacity to accumulate most of the load or toxicants. The analysis of bone is well-suited for studying and monitoring the effects produced by exposure to toxics, since expresses well defined compositional and/or structural changes as a response to the action of these pollutants in the organisms.

2. The methodology described for the characterization of bone tissue can be used to describe the disturbances and metabolic responses of this tissue related to the exposure to pollutants, both in wild and toxicological studies conducted in a laboratory using model species. In our case, we studied the effects of lead exposure in two species of wild birds, Egyptian vulture and Red-legged partridge, as well as exposure to PCBs and mercury in Clapper rails. Likewise, the methodology described has been applied in controlled experiments in which Sprague-Dawley rats were exposed to different dosage of PCB and TCCD.

3. Because of the special features of bone tissue, composed of a nanocrystalline mineral and an organic part, analytical techniques such as XRD and ICP-MS provide us limited information on the composition of the organic part and the characteristics of crystalline mineral of bone tissue. The IR spectrometry technique has been the most useful and interesting among the analytical techniques employed. From detailed

analysis of the FTIR spectra, comprehensive information on the chemical composition of the bone at the molecular level can be obtained. The analysis of the different bands that shape the FTIR spectra is a very useful and sensitive tool to quantify the compositional and structural changes of mineralized tissue of individuals exposed to toxicants. Until now most studies that have used FTIR focused on a descriptive analysis of the spectrum or a visual comparison between qualitative spectra. The choice of a deconvolution method, adjustment and determination of quantitative parameters from FTIR spectra, as well as its application to case studies analyzed in various manuscripts submitted, has undoubtedly been one of the most interesting approaches of the work.

4. The use of bone tissue to study the direct and indirect effects of pollution in organisms is of great interest. The ability to quantify the effects produced by exposure to pollutants, through compositional analysis of the bone, is an important tool to study the impact of these toxicants in the ecosystems. Furthermore, the microstructural and chemical analyses of bone tissue give us insights to understand the mechanisms affecting the metabolism of the organisms by the presence of pollutants in the environment.

5. Studying the chemical composition and structural mineralized tissues can help us to explain the information obtained from various biochemical markers, modified by the existence of a possible toxicity. In the included manuscripts, information obtained through different biochemical markers has supported and complemented the information obtained through analysis of bone mineral.

6. The results for wild bird species exposed to lead pollution show a significant demineralization and altered composition of the bone mineral. The availability of lead in the environment caused by human activities, mainly hunting, has led to illnesses of various kinds in the bone tissue on exposed organisms. Using FTIR spectrometry, we have observed a decrease in the degree of bone mineralization in those organisms exposed to higher levels of lead. This effect can produce a higher incidence of fractures and, consequently, decrease the chance of survival of affected populations.

7. Exposure to PCBs significantly alters the formation of mineralized tissues. These organochlorine pollutants act as endocrine disruptors, producing an alteration of the metabolism of the organisms exposed which in turn affect the proper mineralization of bone tissue. In particular, these toxics affected hormones levels which regulate the normal mineralization of bone. These changes are manifested in significant differences in the chemical composition of bone mineral in organisms exposed to these chlorinated compounds.

8. The methodology and results described in manuscripts are useful tools for animal conservation strategies for the conservation of wildlife threatened by certain toxics. Likewise, these methods establish suitable instruments for assessing the health risks in the human population that have access to the affected ecosystems.

5. Bibliografía

Addadi, L., Weiner, S. (1985) Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 4110-4114.

Addadi, L., Weiner, S. (1992) Control and design principles in biological mineralization. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 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. *British Poultry Science* 46, 268-279.

Alaluusua, S., Lukinmaa, P.L. (2006) Developmental dental toxicity of dioxin and related compounds: A review. *International Dental Journal* 56, 323-331.

Albert, L.A., Bro-Rasmussen, F., Crosby, D.G. (2003) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, Berlin.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 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. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 302, 336-341.

Andrews, J.E. (1989) Polychlorinated biphenyl (Aroclor® 1254) induced changes in femur morphometry calcium metabolism and nephrotoxicity. *Toxicology* 57, 83-96.

Arends, J., Jongebloed, W.L. (1981) Apatite single crystals. Formation, dissolution and influence of CO₃²⁻ ions. *Recueil Review* 1000, 3-9.

Baird, C. (1999) Environmental Chemistry, WH Freeman & Co.

Barron, M.G., Galbraith, H., Beltman, D. (1995) Comparative reproductive and developmental toxicology of PCBs in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology* 112, 1-14.

Basso, N., Jia, Y., Bellows, C.G., Heersche, J.N.M. (2005) The effect of reloading on bone volume, osteoblast number, and osteoprogenitor characteristics: Studies in hind limb unloaded rats. *Bone* 37, 370-378.

Bazylinski, D.A. (1996) Controlled biomineralization of magnetic minerals by magnetotactic bacteria. *Chemical Geology* 132, 191-198.

Beeby, A., Richmond, L. (2002) Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators* 1, 261-270.

Bellrose, F. (1959) Lead poisoning as a mortality factor in waterfowl populations. Illinois Natural History Survey Bulletin 27, 235-288.

Berglund, M., Akesson, A., Bjellerup, P., Vahter, M. (2000) Metal-bone interactions. *Toxicology Letters* 112-113, 219-225.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., Lipp, P. (1998) Calcium-A life and death signal. *Nature* 395, 645-648.

Bjørå, R., Falch, J.A., Staaland, H., Nordsletten, L., Gjengedal, E. (2001) Osteoporosis in the norwegian moose. *Bone* 29, 70-73.

Blakemore, R.P. (1975) Magnetotactic bacteria. *Science* 190, 377-379.

Blitz, R.M., Pellegrino, E.D. (1977) The nature of bone carbonate. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 129, 279-292.

Blumbach, J., Nethe, L.P. (1996) Organic components reduction (PCDD/PCDF/PCB) in flue-gases and residual materials from waste incinerators by use of carbonaceous adsorbents. *Chemosphere* 32, 119-131.

Board, R.G. (1982) Properties of avian egg shells and their adaptive value. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 57, 1-28.

Bohannon, A.D., Cooper, G.S., Wolff, M.S., Meier, D.E. (2000) Exposure to 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene (DDT) in relation to bone mineral density and rate of bone loss in menopausal women. *Archives of Environmental Health* 55, 386-391.

Bohic, S., Rey, C., Legrand, A., Sfihi, H., Rohanzadeh, R., Martel, C., Barbier, A., Daculsi, G. (2000) Characterization of trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. *Bone* 26, 341-348.

Boskey, A.L., Gilder, H., Neufeld, E., Ecarot, B., Glorieux, F.H. (1991) Phospholipid changes in the bones of the hypophosphatemic mouse. *Bone* 12, 345-351.

Boskey, A.L. (1999) Mineralization, Structure, and Function of Bone. Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism. M. J. Seibel, Robins, S. P., Bilezikian, J. P. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, Academic Press: 153-164.

Boskey, A.L., Mendelsohn, R. (2005) Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vibrational Spectroscopy* 38, 107-114.

Boskey, A.L. (2007) Mineralization of bones and teeth. *Elements* 3, 385-391.

Bradley, B. P. (1990) Stress proteins: their detection and uses in biomonitoring. In : Landis, W. G., Van der Schalie, W. H. Aquatic toxicology and risk assessment. Am. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, vol. 30, ASTM STP 1096/338-347.

Broekaert, J. A. C. (2002) Analytical atomic spectrometry with flames and plasma. Weinheim : Wiley-VCH.

Brouwer, A. (1991) Role of biotransformation in PCB-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone metabolism in laboratory and wildlife species. *Biochemical Society Transactions* 19, 731-737.

Brown, M.A. (2005) Genetic studies of osteoporosis. A rethink required. *Calcified Tissue International* 76, 319-325.

Burger, T.T., Mirarchi, R.E., Lisano, M.E. (1986) Effects of lead shot ingestion on captive mourning dove survivability and reproduction. *The Journal of Wildlife Management* 50, 1-8.

Burger, J. (1995) A risk assessment for lead in birds. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 45, 369-396.

Buerger, J., Gochfeld, M. (1996) Lead and behavioral development: parental compensation for behaviorally impaired chicks. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 55, 339-349.

Chalmers, J.M., Griffiths, P.R. (2002) Handbook of Vibrational Spectroscopy (5 Volume Set), John Wiley & Sons.

Checa, A.G, Rodríguez-Navarro, A. (2005) Self-organisation of nacre in the shells of Pterioidea. *Biomaterials* 26, 1071-1079.

Cheek, A.O., Kow, K., Chen, J., McLachlan, J.A. (1999) Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. *Environmental Health Perspectives* 107, 273-278.

Ciccotelli, M., Crippa, S., Colombo, A. (1998) Bioindicators for toxicity assesment of effluents from a wastewater treatment plant. *Chemosphere* 3, 2823-2832.

Clark, A.J., Scheuhammer, A.M. (2003) Lead poisoning in upland foraging birds of prey in Canada. *Ecotoxicology* 12, 23-30.

Clarke, F.J.J., Birch, J.R., Chunnilland, C.J., Smart, M.P. (2002) FTIR measurements—standards and accuracy. *Vibrational Spectroscopy* 30, 25-29.

Cooke, A.S. (1973) Shell thinning in avian eggs by environmental pollutants. *Environmental Pollution* 4, 85-152.

Cooke, P.S., Peterson, R.E., Hess, R.A. (2002) Endocrine disruptors. Handbook of Toxicologic Pathology (Second Edition) 501-528.

Crick, R.E. (1989) Origin, evolution, and modern aspects of biomineralization in plants and animals. Plenum press, New York.

Cullity, B.D. (1978) Elements of X-Ray Diffraction. Reading Mass : Addison Wesley.

Currey, J.D., Brear, K., Zioupos, P. (1996) The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. *Journal of Biomechanics* 29, 257-260.

DeNiro, M.J., Epstein, S. (1978) Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495-506.

Dennos, J.E., Xiau, S., Agarwal, M., Fink, D.J., Heuer, A.H., Caplan, A.I. (1996) Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from white leghorn chicken (*Gallus gallus*). *Journal of Morphology* 228, 287-306.

De Voogt, P., Brinkman, U.A. (1989) Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: Kimbrough, R.D., Jensen, A.A., eds. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products. 2nd ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers, 3-45.

Dove, P.M., De Yoreo, J.J., Weiner, S. (2003) Biomineralization. Reviews in Mineralogy and Geochemistry 54.

Drabæk, I., Iverfeldt, Á. (1995) Mercury speciation in biological matrices. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* 17, 305-318.

Drash, G., Wanghofer, E., Roider, G. (1997) Are blood, urine hair and muscle valid biomonitors for the internal burden of men with heavy metals mercury, lead and cadmium?. *Trace Elements and Electrolytes* 14, 116-123.

Durant, D., Pereira, R.M.R., Canalis, E. (2004) Overexpression of insulin-like growth factor binding protein-5 decreases osteoblastic function in vitro. *Bone* 35, 1256-1262.

Eisenreich, S.J., Baker, J.E., Franz, T. (1992) Atmospheric deposition of hydrophobic organic contaminants to the Laurentian Great Lakes. In: Schnoor, J.L. ed. Fate of pesticides and chemicals in the environment. New York, NY: John Wiley and Sonss, Inc., 51-78.

Ehle, A.L. (1993) Lead. Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition. R. Macrae, R.K. Robinson, Sadler, M.J. (Eds.), Academic Press, London. 2665-2673.

El Feki, H., Rey, C., Vignoles, M. (1991) Carbonate ions in apatites: Infrared investigations in the ν_4 CO_3 domain. *Calcified Tissue International* 49, 269-274.

Eriksen, E.F., Colvard, D.S., Berg, N.J., Graham, M.L., Mann, K.G., Spelsberg, T.C., Riggs, B.L. (1988) Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241, 84-86.

Faibish, D., Gomes, A., Boivin, G., Binderman, I., Boskey, A. (2005) Infrared imaging of calcified tissue in bone biopsies from adults with osteomalacia. *Bone* 36, 6-12.

Fair, J.M., Ricklefs, R.E. (2002) Physiological, growth, and immune responses of Japanese quail chicks to the multiple stressors of immunological challenge and lead shot. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* 42, 77-87.

Fant, M.L., Nyman, M., Helle, E., Rudbäck, E. (2001) Mercury, cadmium, lead and selenium in ringed seals (*Phoca hispida*) from the Baltic Sea and from Svalbard. *Environmental Pollution* 111, 493-50.

Ferrandis, P., Mateo, R., López-Serrano, F.R., Martínez-Haro, M., Martínez-Duro, E. (2008) Lead-shot exposure in red-legged partridge (*Alectoris rufa*) on a driven shooting estate. *Environmental Science & Technology* 42, 6271-6277.

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.

Fink, D. J., Caplan, A. I., Heuer, A H. (1992) Eggshell mineralization: A case study of a bioprocessing strategy. *Mrs Bulletin* 27-31.

Ford, M.A., Spragg, R.A. (1986) A simple method of measuring emission spectra with an FT-IR spectrometer. *Applied Spectroscopy* 40, 715-716.

Fossi, M.C. (1994) Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 102, 49-54.

Frankel, R.B., Blakemore, R.P. (1991) Iron Biominerals. Plenum Publisher, New York, 434.

Franson, J.C., Sileo, L., Pattee, O.H., Moore, J.F. (1983) Effects of chronic dietary lead in american kestrels (*Falco sparverius*). *Journal of Wildlife Diseases* 19, 110-113.

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. *Journal of Wildlife Management* 66, 811-821

Gautron, J., Bain, M., Solomon, S., Nys, Y. (1993) Soluble matrix proteins of the hen's egg shell delay the precipitation of calcium carbonate in vitro and affect morphology of the crystal. In: Proceedings of the 5th European Symposium on the quality of eggs and egg products. Tours, French. 191-197.

Gautron, J., Bain, M., Solomon, S., Nys, Y. (1996) Soluble matrix of hen's eggshell extracts changes in vitro the rate of calcium carbonate precipitation and crystal morphology. *British Poultry Science* 37, 853-866.

Gehron, R.P, Boskey, A.L. (1996) The biochemistry of bone. In: Marcus R, Feldman D., eds. Osteoporosis. New York: Raven Press.

Gierthy, J.F., Silkworth, J.B., Tassinari, M., Stein, G.S., Lian, J.B. (1994) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits differentiation of normal diploid rat osteoblasts in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 54, 231-238.

Glimcher, M.J. (1998) The nature of the mineral phase in bone: biological and clinical implications. In: Avioli LV, Krane SM., eds. Metabolic bone disease and clinically related disorders. 3rd ed. San Diego.

Grasman, K.A., Scanlon, P.F. (1995) Effects of acute lead ingestion and diet on antibody and T-cell-mediated immunity in Japanese quail. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28, 161-167.

Graves, G.R., Romanek, C.S., Rodriguez-Navarro, A.B. (2002) Stable isotope signature of philopatry and dispersal in a migratory songbird. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 8096- 8100.

Griffiths, P.R., De Haset, J.A. (2007) Introduction to vibrational spectroscopy. *Chemical Analysis* 171, 1-18.

Grinnel, G.B. (1984) Lead poisoning. *Forest and Stream* 42, 117-118.

Groot, P.A. (2004) Handbook of stable isotope analytical techniques. Amsterdam : Elsevier.

Gross, J. H. (2004) Mass spectrometry: A textbook. Berlin : Springer.

Gruber, H.E., Gonick, H.C., Khalil-Manesh, F., Sanchez, T.V., Motsinger, S., Meyer, M. (1997) Osteopenia induced by long-term, low- and high-level exposure of the adult rat to lead. *Mineral and Electrolyte Metabolism* 23, 65-73.

Grynblas, M.D. (1990) Fluoride effects on bone crystals. *Journal of Bone and Mineral Research Suppl-1*, S169-S175.

Gonzalez, L.M., Hiraldo, F. (1988) Organochlorine and heavy metal contamination in the eggs of the Spanish Imperial Eagle (*Aquila (heliaca) adalberti*) and accompanying changes in eggshell morphology and chemistry. *Environmental Pollution* 51, 241-258.

Gould, J.L., Kirschvink, J.L., Deffeyes, K.S. (1978) Bees have magnetic remanence. *Science* 201, 1026-1028.

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. *General and Comparative Endocrinology* 106, 221-230.

Hallsworth, A.S., Weatherell, J.A., Robinson, C. (1973) Loss of carbonate during the first stages of enamel caries. *Caries Research* 7, 345-348.

Hamilton, J.D., O'Flaherty, E.J. (1995) Influence of lead in mineralization during bone growth. *Fundamental and Applied Toxicology* 26, 265-271.

Hedges, R.E.M., Stevens, R.E., Richards, M.P. (2004) Bone as a stable isotope archive for local climatic information. *Quaternary Science Reviews* 23, 959-965.

Herschel, F.W. (1800) The discovery of infrared light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 90, 49.

Hites, R.A. (2007) Elements of environmental chemistry. N.J. Wiley.

Hoefs, J. (1997) Stable isotope geochemistry. Berlin : Springer-Verlag.

Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A.Jr., John Cairns, J.Jr. (2002) Handbook of Ecotoxicology, Second Edition.

Hoffmann, E. (1999) Mass spectrometry : principles and applications / Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant. Chichester : John Wiley and Sons.

Ishikawa, Y., Noma, Y., Mori, Y., Sakai, S. (2007) Congener profiles of PCB and a proposed new set of indicator congeners. *Chemosphere* 67, 1838-1851.

Jämsä, T., Viluksela, M., Tuomisto, J.T., Tuomisto, J., Tuukkanen, J. (2001) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on bone in two rat strains with different aryl hydrocarbon receptor structures. *Journal of Bone and Mineral Research* 16, 1812-1820.

Kandori, K., Masunari, A., Ishikawa, T. (2005) Study on adsorption mechanism of proteins onto synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements. *Calcified Tissue International* 76, 194-206.

Kannan, K., Maruya, K.A., Tanabe, S. (1997) Distribution and characterization of polychlorinated biphenyl congeners in soil and sediments from a superfund site contaminated with Aroclor 1268. *Environmental Science and Technology* 31, 1483-1488.

Kannan, K.N., Stafford, R., Masson G.R., Tanabe, S., Giesy, J.P. (1998) Bioaccumulation and toxic potencial of extremely hydrophobic polychlorinated biphenyl congeners in biota collected at a superfund site contaminated with Aroclor 1268. *Environmental Science and Technology* 32, 1214-1221.

Kanti, A., Smith, M.A. (1997) Effect of heavy metals on chondrogenic differentiation of embryonic chick limb cells. *In vitro toxicology* 10, 329-338.

Kelly, J.F. (2000) Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology* 78, 1-27.

Kent, C. (1998) Basics of Toxicology. John Wiley & Sons.

Kikuchi, M., Ikoma, T., Itoh, S., Matsumoto, H.N., Koyama Y., Takakuda, K., Shinomiya, K., Tanaka, J. (2004) Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Composites Science and Technology* 64, 819-825.

Krassas, G.E., Papadopoulou, P. (2001) Oestrogen action on bone cells. *Journal Musculoskelet Neuronal Interaction* 2, 143-51.

Landis, W.G., Yu, M-H. (2000) Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems. Lewis Publishers. Springer Netherlands.

Lajtha, K., Michener, R.H. (1994) Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Leikin, J.B., Paloucek, F.P. (Ed.) (1997) Poisoning and toxicology handbook. Boca Raton: CRC Press.

Lian, J.B., Stein, G.S., Canalis, E., Robey, P.G., Boskey, A.L. (2003) Bone formation: Osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. *American Society for Bone and Mineral Research* 4, 14-29.

Lind, P.M., Eriksen, E.F., Sahlin, L., Edlund, M., Örberg, 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. *Toxicology and Applied Pharmacology* 154, 236-244.

Lind P.M., Larsson, S., Oxlund H., Hakansson H., Nyberg K., Eklund T., Örberg 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.

Lind, P.M., Eriksen, E.F., Lind, L., Örberg, 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.

Lind, P.M., Milnes, M.R., Lundberg, R., Bermudez, D., Örberg, J., Guillette, L.J.Jr. (2004) Abnormal bone composition in female juvenile American alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka, Florida). *Environmental Health Perspectives* 112, 359-362.

Lippmann, F. (1973) Sedimentary Carbonate Minerals. Springer-Verlag, Berlin.

Lowenstam, H.A. (1962) Magnetite in denticle capping in recent chitons. *Geological Society of American Bulletin* 73, 435-438.

Lowenstam, H.A., Weiner S. (1989) On Biomineralization. Oxford Univ. Press, New York.

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*). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part-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. *Archives of Toxicology* 65, 220-227.

Manahan, S.E. (1999) Environmental Chemistry 7th. Edition. Lewis. Publishers, New York.

Mann, S. (2001) Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry. Oxford University Press, NY.

Mann, S., Webb, J., Williams, R.J.P. (Eds) (1989) Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives. VCH: Weinheim.

Martin, R.B. (1993) Aging and strength of bone as a structural material. *Calcified Tissue International* 53, 34-40.

Mateo, R., Molina, R., Grífols, J., Guitart, R. (1997) Lead poisoning in a free ranking griffon vulture (*Gyps fulvus*). *Veterinary Record* 140, 47-48.

Mateo, R., Belliure, J., Dolz, J.C., Aguilar, J.M., Guitart, R. (1998) High prevalences of lead poisoning in wintering waterfowl in Spain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 342-347.

McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (1990) Biological Markers of Environmental Contamination, Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

McNabb, F.M.A., Fox, G.A. (2003) Avian thyroid development in chemically contaminated environments: Is there evidence of alterations in thyroid function and development?. *Evolution & Development* 5, 76-82.

Michelson, A.A. (1891) On the application of interference methods to spectroscopic measurements. *Philosophical Magazine* 31, 338-346.

Miettinen, H.M., Pulkkinen, P., Jamsa, T., Koistinen, J., Simanainen, U., Tuomisto, J., Tuukkanen, J., Viluksela, M. (2005) Effects of in utero and lactational TCDD exposure on bone development in differentially sensitive rat lines. *Toxicological Sciences* 85, 1003-1012.

Miller, L.S., Vairavamurthy, V., Chance, M.R., Mendelsohn, R., Paschalis, E.P., Betts, F., Boskey, A.L. (2001) In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO_4^{3-} vibration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1527, 11-19.

Millington-Ward, S., McMahon, H.P., Farrar, G.J. (2005) Emerging therapeutic approaches for osteogenesis imperfecta. *Trends in Molecular Medicine* 11, 299-305.

Mills, S.A., Thal, D.I., Barney, J. (2007) A summary of the 209 PCB congener nomenclature. *Chemosphere* 68, 1603-1612.

Murphy, T.J., Formanski, L.J., Brownawell, B., Meyer, J.A. (1985) Polychlorinated biphenyl emissions to the atmosphere in the Great Lakes region. Municipal landfills and incinerators. *Environmental Science and Technology* 19, 924-946.

Nieesink, R.J.M., Vries, J., Hollinger, M.A. (1996) Toxicology. Principles & Applications CRC Press.

Nys, Y., Hincke, M.T., Arias, J.L., Garcia-Ruiz, J.M., Solomon, S.E. (1999) Avian eggshell mineralization. *Poultry Avian Biology Reviews* 10, 143-166.

Ohyama, Y., Akira, N., Yukiko, M., Teruo, A., Masaki, N. (2004) Spatiotemporal association and bone morphogenetic protein regulation of Sclerostin and Osterix expresión during embryonic osteogenesis. *Endocrinology* 145, 4685-4692.

Onoe, Y., Miyaura, C., Ohta, H., Nozawa, S., Suda, T. (1997) Expression of estrogen receptor β in rat bone. *Endocrinology* 138, 4509-4512.

Orwoll, E.S., Stribrska, L. (1991) Androgen receptors in osteoblast-like cell lines. *Calcified Tissue International* 49, 182-87.

Ou-Yang, H., Paschalis, E.P., Mayo, W.E., Boskey, A.L., Mendelsohn, R. (2001) Infrared microscopic imaging of bone: spatial distribution of CO_3^{2-} . *Journal of bone and mineral research* 16, 893-900.

Pain, D.J., Meharg, A.A., Ferrer, M., Taggart, M., Penteriani, V. (2005) Lead concentrations in bones and feathers of the globally threatened Spanish imperial eagle. *Biological Conservation* 121, 603-619.

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. *Science of the Total Environment* 376, 116-127.

Paschelis, E.P., Jacenko, O., Olsen, B., Mendelsohn, R., Boskey, A.L. (1996) Fourier transform infrared microspectroscopic analysis identifies alterations in mineral properties in bones from mice transgenic for type X collagen. *Bone* 19, 151-156.

Pattee, O.H., Hennes, S.K. (1983) Bald eagles in waterfowl: the lead shot connection. *Transactions of the North American Wildlife and Natural Resources Conference* 48, 230-237.

Pattee, O.H. (1984) Eggshell thickness and reproduction in American kestrels exposed to chronic dietary lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13, 29-34.

Petering, H.G., Tepper, L.B. (1976) Pharmacology and toxicology of heavy metals: Mercury. *Pharmacology & Therapeutics. Part A: Chemotherapy, Toxicology and Metabolic Inhibitors* 1, 131-151.

Portigal, 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. *Toxicology and Applied Pharmacology* 179, 185-194.

Posner, A.S. (1970) Significance of calcium phosphate crystallographic studies to orthopedics. *Bulletin Hospital Joint Disease* 31, 14-26.

Puga, A., Tomlinson, C.R., Xia, Y. (2005) AHR receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochemical Pharmacology* 69, 199-207.

Puhvel, S.M., Sakamoto, M., Ertl, D.C., Reisner, R.M. (1992) Hairless mice as models for chloracne: A study of cutaneous changes induced by topical application of established chloracnogens. *Toxicology and Applied Pharmacology* 64, 492-503.

Punshon, T., Gaines, K.F., Bertsch, P.M., Burger, J. (2003) Bioavailability of uranium and nickel to vegetation in a contaminated riparian ecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1146-1154.

Puzas, J.D., Sickel, M.J., Felter, M.E. (1992) Osteoblasts and chondrocytes are important target cells for the toxic effects of lead. *Necro Toxicology* 13, 783-788.

Ramajayam, G., Sridhar, M., Karthikeyan, S., Lavanya, R., Veni, S., Vignesh, R.C., Ilangovan, R., Djody, S.S., Gopalakrishnan, V., Arunakaran, J., Srinivasan, N. (2007) Effects of Aroclor 1254 on femoral bone metabolism in adult male Wistar rats. *Toxicology* 241, 99-105.

Ramo, C., Sanchez, C., Hernandez, S.A. (1992) Lead poisoning of greater flamingos *Phoenicopterus ruber*. *Wildfowl* 43, 220-222.

Readig, P.T., Stowe, C.M.; Barnes, D.M., Arent, T.D. (1980) Lead toxicosis in raptors. *Journal of American Veterinary Medical Association* 177, 941-943.

Reding, P.T., Lawler, E.M., Schwartz, S., Dunnette, J.L., Stephenson, B., Duke, G.E. (1991) Effects of chronic exposure to sublethal concentrations of lead acetate on heme synthesis and immune function in red-tailed hawks. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21, 72-77.

Reggiani, G. (1981) Toxicology of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): Short review of its formation, occurrence, toxicology, and

kinetics, discussing human health effects, safety measures, and disposal. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1, 211-243.

Reggiani, G. (1983) Toxicology of TCDD and related compounds: Observations in man. *Chemosphere* 12, 463-475.

Rey, C., Collins, B., Goehl, T., Dickson, I.R., Glimcher, M. (1989) The carbonate environment in bone mineral: a resolution enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcified Tissue International* 45, 157-164.

Rey, C., Shimizu, M., Collins, B., Glimcher, M. (1990) Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of phosphate ions in the early deposits of a solid phase of calcium-phosphate in bone and enamel, and their evolution with age. I: Investigations in the ν_4 PO₄ domain. *Calcified Tissue International* 46, 384-394.

Rey, C., Renugopalakrishnan, V., Shimizu, M., Collins, B., Glimcher, M.J. (1991) A resolution-enhance Fourier transform infrared spectroscopy study of the environment of the CO₃²⁻ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation. *Calcified Tissue International* 49, 259-268.

Rocke, T.E., Samuel, M.D. (1991) Effects of lead shot ingestion on selected cells of the mallard immune system. *Journal of Wildlife Diseases* 27, 1-9.

Rodriguez-Navarro, A., Garcia-Ruiz, J.M. (2000) Model of textural development of layered crystal aggregates. *European Journal of Mineralogy* 12, 609-614.

Rodriguez-Navarro, A., Kalin, O., Nys, Y., Garcia-Ruiz, J.M. (2002). Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *British Poultry Science* 43, 395-403.

Rodriguez-Navarro, A.B., Gaines, K. F., Romanek, C.S., Masson, G.R. (2002) Mineralization of Clapper Rail eggshell from a contaminated salt marsh system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 449-460.

Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., Alvarez-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. *Environmental Science and Technology* 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.

Ronis, M.J.J., Aronson, J., Gao, G.G , Hogue, W., Skinner, R.A., Badger, T.M., Lumpkin, C.K.Jr. (2001) Skeletal effects of developmental lead exposure in rats. *Toxicological Sciences* 62, 321-329.

Ross, D.S. (1998) Bone disease in hyperthyroidism. In: L V Avioli and S M Krane, Editors, *Metabolic Bone Disease*, Academic Press, San Diego, 531-544.

Ross, P.D., Knowlton, W. (1998) Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers. *Journal of Bone and Mineral Research* 13, 297-302.

Ross, P.D., Kress, B.C., Parson, R.E. Wasnich, R.D., Armour, K.A., Mizrahi, I.A. (2000) Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone

density predict fractures: a prospective study. *Osteoporosis International* 11, 76-82.

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. *Environmental Pollution* 46, 263-295.

Scheuhammer, A.M., Norris, S.L. (1996) The ecotoxicology of lead shot and lead fishing weights. *Ecotoxicology* 5, 279-295.

Schiller, C.M., Adcock, C.M., Moore, R.A., Walden, R. (1985) Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and fasting on body weight and lipid parameters in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 81, 356-361.

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. *Marine Biology* 142, 473-485.

Seegal, R.F., Brosch, K.O., Bush, B. (1986) Regional alterations in serotonin metabolism induced by oral exposure of rats to polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology* 7, 155-166.

Shugart, L.R. (2000) DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology* 9, 329-340.

Simkiss, K., Wilbur, K.M. (1989) Biomineralization: Cell biology and Mineral Deposition. Academic Press, Inc.

Singh, S.U., Casper, R.F., Fritz, P.C., Sukhu, B., Ganss, B., Girard, B., Jr., Savouret, J.F., Tenenbaum, H.C. (2000) Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *Journal of Endocrinology* 167, 183-195.

Suárez, C., Urios, V. (1999) La contaminación por saturnismo en las aves acuáticas del Parque Natural de el Hondo y su relación con los hábitos alimenticios. Sede para el estudio de los Humedales Mediterráneos. *Sehumed* 1, 83-90.

Suter, G.L. (1990) Use of biomarkers in ecological risk. assessment. In: J.F. McCarthy and L.R. Shugart (eds.), 419-426.

Suzuki, T., Imura, N., Clarkson, T.W. (1991) Advances in Mercury Toxicology, Plenum Press, New York.

Tabuchi, M., Veldhoen, N., Dangerfield, N., Jeffries, S., Helbing, C.C., Ross, P.S. (2006) PCB-related alteration of thyroid hormones and thyroid hormone receptor gene expression in free-ranging harbor seals (*Phoca vitulina*). *Environmental Health Perspectives* 114, 1024-1031.

Tieszen, L.L., Boutton, T.W., Tesdahl, K.G., Slade, N.A. (1983) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for ¹³C analysis of diet. *Oecologia* 57, 32-37.

Tortora, G.J. (1996) Principles of Anatomy and Physiology. New York: Addison Wesley Longman.

Treon, J.F., Cleveland, M.D., Cappel, J.W., Atchley, R.W. (1956) The toxicity of the vapors of Aroclor® 1242 and Aroclor® 1254. *American Industrial Hygiene Association Journal* 17, 204-213.

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 biosurveillance programmes. *The Science of the Total Environment* 312, 79-88.

Walker, M.M., Kirschvink, J.L., Chang, S.R., Dizon, A.E. (1984) A candidate Magnetic sense organ in the tellowfish tuna, *Thunnus albacares*. *Science* 224, 751-753.

Watson, J.T. (2007) Introduction to mass spectrometry : instrumentation, applications, and strategies for data interpret. Hoboken, N.J. : John Wiley.

Watrous, D.A., Andrews B.S. (1989) The metabolism and immunology of bone. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 19, 45-65.

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. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 341, 116-120.

Whetsell, M., Bagriacik, E.U., Seetharamaiah, G.S., Prabhakar, B.S., Klein, J.R. (1999) Neuroendocrine-induced synthesis of bone marrow-derived cytokines with inflammatory immunomodulating. *Properties Cellular Immunology* 192, 159-166.

White, M.P. (1998) Chapter 24. Skeletal disorders characterized by osteosclerosis or hyperostosis. In *Metabolic Bone Disease and clinically related disorders*. L.V. Avioli, S. M. Krane, 1998, San Diego, Academic press.

WHO-ECEH/IPCS (2000) Assessment of the health risk of dioxins:reevaluation of the tolerable daily intake (TDI). *Food Additives and Contaminants* 17, 223-369.

Williams, D.B., Carter, B. (1996) Transmission Electron Microscopy, Diffraction II, Plenum Press, New York.

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. *Aquatic Toxicology* 73, 394-405.

Wopenka, W., Pasteris, J.D. (2005) A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering C* 25, 131-143.

Wright, D.A., Welbourn, P. (2002) Environmental toxicology. New York:Cambridge University Press.

MANUSCRIPTS

- I. Effect of *in ovo* exposure to PCBs and Hg on clapper rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia (2006) Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., **Alvarez-Lloret, P.**, Gaines, K.F. *Environmental Science and Technology* 40 (16), 4936-4942.
Pag. 139
- II. Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources. Gangoso, L., **Álvarez-Lloret, P.**, Rodríguez-Navarro, A.B., Mateo, R., Hiraldo, F., Donázar, J.A. *Environmental Pollution* (In press).
Pag. 147
- III. Short-term exposure to dioxin impairs bone tissue in male rats. Lind, P.M., Wejheden, C., Lundberg, R., **Alvarez-Lloret, P.**, Hermsen, S.A.B., Rodriguez-Navarro, A.B., Larsson, S., Moncek F., Rannug, A. *Submitted to Chemosphere*.
Pag. 177
- IV. Effects of 3,3',4,4', 5 - pentachlorobiphenyl (PCB126) on vertebral bone mineralization and on thyroxin and vitamin D levels in Sprague-Dawley rats. **Alvarez-Lloret, P.**, Lind, P.M., Nyberg, I., Örberg, J., Rodríguez-Navarro, A.B. *Submitted to Toxicology Letters*.
Pag. 199
- V. Effect of lead-shot ingestion on bone mineralization in a population of red-legged partridge (*Alectoris rufa*). **Alvarez-Lloret, P.**, Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., Ferrandis, P., Mateo, R. *Manuscript*.
Pag. 223

Effect of In Ovo Exposure to PCBs and Hg on Clapper Rail Bone Mineral Chemistry from a Contaminated Salt Marsh in Coastal Georgia

ALEJANDRO B. RODRIGUEZ-NAVARRO,* †
CHRISTOPHER S. ROMANEK, ‡ §
PEDRO ALVAREZ-LLORET, † AND
KAREN F. GAINES †

Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, 18002 Granada, Spain, Savannah River Ecology Laboratory, University of Georgia, Drawer E, Aiken, South Carolina 29802, Department of Geology, University of Georgia, Athens, Georgia 30602, and Department of Biological Sciences, Eastern Illinois University, Charleston, Illinois 61920-3099

The effect of Hg and PCBs (Aroclor 1268) on bone characteristics was investigated in a population of Clapper Rails (*Rallus longirostris*) inhabiting contaminated and unimpacted estuarine marsh systems in coastal Georgia. Exposure to contaminants did not affect the length or weight of leg bones, but it significantly altered the chemical composition of the bone. Specifically, bone in the contaminated site had a higher Ca to P, and lower carbonate and acid phosphate content. These characteristics are typical of more mature bone mineral and indicate that toxicants have accelerated bone maturation. FTIR spectroscopy data revealed a dose dependent change in the crystallinity of bone mineral, and the relative proportion of specific PO₄ groups in different molecular environments in the bone, with toxicants loads. These changes are most probably related to a hormonal alteration of the rate of bone remodeling induced by exposure to toxicant loads.

Introduction

Bone is a metabolically active calcified tissue in constant remodeling (1). It is composed of an organic matrix (mainly collagen type I (>90%)) and a mineral component (nanocrystalline carbonate hydroxylapatite) in proportions varying with age and location within the skeleton. Stoichiometric apatite has a Ca to P molar ratio of 1.67, while bone mineral is slightly lower mainly due to ionic substitution (Na, Mg, HPO₄ (acid phosphate), and CO₃ ions). As bone matures, bone mineral becomes more crystalline, its Ca to P ratio increases and its content of carbonate and acid phosphate decreases. Also, there is a progressive decrease in the rate of bone turnover with age. Consequently, the proportion of mature and well-crystallized mineral to newer, less crystalline, mineral varies with time and also with health condition (1, 2).

Bone mineralization is regulated by a complicated array of feedback processes which can be altered by different

genetic, endocrine, and environmental factors, resulting in abnormal or pathological composition of bone (1, 2). There is an increasing interest in medical (1, 2) and toxicological research (3–10) related to the factors that alter bone mineralization. From toxicology studies, it is well-known that environmental pollutants (e.g., heavy metals, organochlorines) cause skeletal defects and malformations in laboratory models and wild animals (3–10). Recent studies indicate that heavy metals may exert both direct and indirect controls on bone turnover. Hg, Pb, and Cd are nephrotoxic, and are known to affect Ca metabolism; for instance, kidneys produce the active form of vitamin D, which is involved in Ca homeostasis (4). They can also directly affect bone turnover by altering osteoblast and osteoclast function (5, 11). On the other hand, bone metabolism is both estrogen- and androgen-dependent (i.e., after menopause or ovariectomy there is accelerated bone loss caused mainly by estrogen deficiency) (7, 9). Exposure to organochlorines (e.g., DDT, PCB, dioxins), which are endocrine disruptors can negatively affect bone formation and composition (6–7, 9–10, 12–14). In laboratory experiments, ovariectomized rats exposed to PCBs (PCB 126) resulted in a decrease in bone length and an increase in bone mineral density (7). In this case, PCB exposure reversed the effects expressed by estrogen deficiency after ovariectomy (i.e., decreased bone density). In other studies, exposure to PCBs showed the opposite effects and produced a decreased bone mineral density and other bone pathologies (e.g., tooth loss) (6, 9, 13, 15).

Both Hg and the PCB Aroclor mixture 1268 exist in relatively high concentration at a contaminated salt marsh in coastal Georgia in the Brunswick area contaminated from decades of chemical perturbations (16–19). Specifically, this contamination has originated from waste disposal from a mercury-cell-type chlor-alkali plant and other industries that were operating at this site in the past (16). Due to their elevated levels of contamination, the site known as Linden Chemicals and Plastics (LCP) has been classified as a Superfund site. To investigate the proximate and ultimate effects of these co-contaminants on resident organisms in this site ecosystem, Clapper Rails (*Rallus longirostris*) were chosen for study as this species has well-known foraging habits, strong site fidelity, and relatively small home ranges (typically <5 ha.) (20). Clapper Rails feed exclusively on benthic organisms in salt marshes, primarily crabs, crayfish, mollusks, worms, and other marine organisms (21, 22). Through these feeding habits, individuals within the LCP marsh accumulate significant amounts of Hg and Aroclor 1268 associated with sediments (23).

A previous study of Clapper Rails inhabiting this marsh system showed that females produced eggs having shells that were abnormally thin and brittle, with altered microstructure (24). These findings suggest that Hg and/or Aroclor 1268 may have affected Ca metabolism. If this was the case, it is highly likely that bone metabolism, which is dependent on Ca-metabolism, was altered as well. The effects of contaminants potentially affecting bone should be more pronounced in newborn hatchlings. Developing and young organisms are typically more sensitive to the toxic effects of pollutants, as well as altricial species, which are often more sensitive than precocial species (4). To test this hypothesis, Clapper Rail eggs from the LCP contaminated and unimpacted Brunswick sites were collected, incubated, and hatched. Leg bones characteristics (bone dimensions and chemical composition) from hatchlings were compared to evaluate the effects of prenatal exposure to contaminants on bone formation.

* Corresponding author phone: +34 958 240059; fax: +34 958 243368; e-mail: anava@ugr.es.

† Dpto. Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada.

‡ Savannah River Ecology Laboratory, University of Georgia.

§ Department of Geology, University of Georgia.

‡ Eastern Illinois University.

Materials and Methods

Two adjacent study areas were chosen for this study:

Contaminated Marsh—LCP. This site is a salt marsh contaminated primarily with Hg and the PCB Aroclor 1268 at a high priority Superfund site (Linden Chemicals and Plastics; LCP) in Brunswick, Georgia. At this site, Hg and Aroclor 1268 have been found in elevated levels in the sediments and resident fauna (crabs, fish, birds) (16–19, 23).

Reference Marsh—Blythe Island. A reference marsh “Blythe Island”, located approximately 5 km from the LCP site that was not directly contaminated was chosen as a close analogue to the LCP site based on similar vegetation, tidal influence, tidal creek diversity, and water chemistry (20, 23). Similarity between sites other than contaminant levels should allow the identification of effects that those contaminants from LCP had on birds.

Clapper Rail eggs were collected from nests from the LCP and Blythe Island locations during the nesting season in March to June 2000. In total 161 eggs (from 21 nests) were collected at LCP site and 90 (from 14 nests) at Blythe Island. They were incubated at 37 °C and 95% relative humidity in an incubator (Humidaire incubator separate hatcher, Humidaire incubator Co.) and rotated automatically every 12 h for 21–23 days until hatching. For eggs that did hatch, within 48 h, chicks were observed for behavior abnormalities and then sacrificed and stored in a freezer for later analysis.

Twenty hatchlings each from the LCP and Blythe Island sites were selected for the study. Bones (femur, tibia, and fibula) were removed from one leg of each animal using a scalpel. They were rinsed with MilliQ water, dried overnight in an oven at 40 °C, and weighed with a microbalance (M2P; Sartorius). Bone marrow was extracted by cutting each bone lengthwise and physically removing interior material with a scalpel. After cleaning again with Milli-Q water, the bones from each individual were combined and ground with a cryogenic mill (CertiPrep 6750 Freezer/Mill, SPEX).

Whole body concentrations of Hg and Aroclor 1268 were determined for these hatchlings in a separated study (23). Analytical procedures used for the determination of whole body metals and Aroclor 1268 concentrations have been described in detail elsewhere (23, 25). Shortly, individuals were grounded using a cryogenic mill. A portion of the homogenized sample (100 mg) was used for metals determination and analyzed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP–MS, Elan 6000, Perkin Elmer). In the remaining portion, PCBs were extracted using organic solvents and analyzed using a gas chromatograph equipped with an electron capture detector (GC 6890, Hewlett Packard). Identification of congeners was confirmed by mass spectrometric analyses.

The chemical composition of the combined leg bone was determined by ICP–MS and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). For the ICP–MS analyses, 3 mg of bone powder was microwave digested in a 10 mL solution of 10% HNO₃ and 3% H₂O₂. Ca and P concentrations were measured using an Elan 6000 ICP–MS (Perkin-Elmer). The precision of the chemical analyses was better than 1 ppm. For quality control purposes, standard trace grade solutions containing Ca and P in sample range concentrations were prepared and analyzed after every five samples. All standard solutions were within 5% of the reported values.

For the FTIR analyses, 3 mg of bone powder was mixed with 200 mg of FTIR-grade KBr and pressed under vacuum at 9 metric tons of pressure for 20 min. Infrared spectra were recorded using a FTIR spectrometer (Magna IR 860, Nicolet) at 2 cm⁻¹ resolution over 1024 scans. The amounts of phosphate, carbonate, and organic matrix in bone were determined from the peak area of absorption bands associated with phosphate, carbonate, and amide groups in the

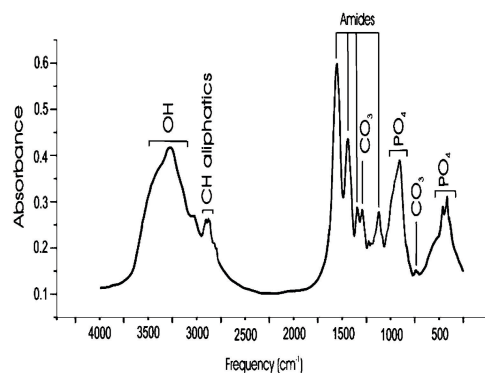


FIGURE 1. FTIR spectrum of a Clapper Rail chick bone. The peaks displayed in the spectrum correspond to the absorption of different molecular species present in bone tissue. The intensity of the peaks is proportional to the concentration of the component associated to the absorption band.

infrared spectra (Figure 1). In case of a single molecular group generating several bands, only peaks from the most intense band were used for analyses (e.g., peaks from phosphate band at 900–1200 cm⁻¹ were used rather than those from 500 to 650 cm⁻¹). Overlapping peaks were resolved and their integrated areas measured using curve fitting software (Peakfit). This software separated overlapping peaks using a second derivative methodology, allowing for a detailed and quantitative analysis of different molecular constituents of bone mineral. For this methodology, Peakfit software needs to set several parameters. Specifically, for our analyses, peaks were fitted to a mixed Gaussian + Lorentzian function. Peak amplitude and position were allowed to vary within 10% and 10 cm⁻¹, respectively, while curve shape and width were allowed to vary freely. The degree of smoothing was set at 10% (at the 1200–900 cm⁻¹ band) and 15% (at the 1950–1350 cm⁻¹ band). The number of peaks in each band analyzed was held constant. For the 1200–900 cm⁻¹ and the 1950–1350 cm⁻¹ bands, the number of peaks was seven and four, respectively. Locations of peaks in the two main regions analyzed are shown in Figure 2.

Even in carefully prepared KBr disks, sample powder is not homogeneously distributed resulting in large variation of absolute peak intensities in the FTIR spectra. To minimize this effect and be able to do quantitative comparison among samples, peak areas were normalized to the area of 3800–2800 cm⁻¹ band region associated with OH groups (Figure 1). The peak area of C–H stretching band was removed from this region. The resulting area ratios are represented by a capital “A”, followed by the peak or band position (e.g., A1660, A1405). Alternatively, to evaluate the contribution of individual components, associated to different molecular environments, within a particular region (e.g., HPO₄ within the PO₄ band region), deconvoluted peak areas were normalized to the relevant band region area from which they derived (e.g., A900_1200). These peak area ratios are designated using “a”, followed by the peak position (e.g., a953, a985, a1010). Error in the determination of normalized peak areas was 10% or less. This error was estimated by repeatedly measuring the same sample 10 times.

The following parameters were used to characterize bone composition and crystallinity from FTIR analyses:

The degree of mineralization of bone (mineral) (2) is defined as the mineral to organic matrix ratio and was estimated as follows:

$$\text{mineral} = A1200_900/A1660 \quad (1)$$

where A1200_900 represent the amount of phosphate in bone and A1660 the amount of amide I groups (main band from bone organic matrix).

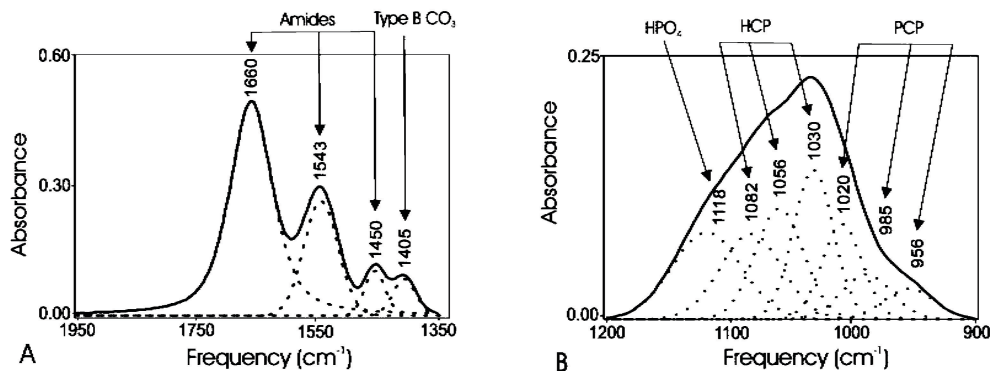


FIGURE 2. Overlapping peaks constituting two main band regions. (A) The 1950–1350 cm^{-1} region contains three main peaks, 1660, 1550, and 1450 cm^{-1} , associated with different vibration modes for amide groups in collagen, and a fourth peak at 1405 cm^{-1} for carbonate groups (type B mineral substitution). (B) The 1200–900 cm^{-1} band region, associated with phosphate groups, is composed of seven peaks. HCP and PCP stand for highly and poorly crystalline phosphate, respectively.

TABLE 1. Concentration of Toxicants (Hg and PCB mixture (Aroclor 1268)) Sediments, Fiddler Crabs, and Clapper Rail Hatchlings (whole body load), from Blythe Island and LCP Site^a

	Blythe Island		LCP site		ANOVA test			
	mean \pm SD	N	mean \pm SD	N	F	df1	df2	P
Sediments								
Hg (ppm)	0.18 \pm 0.07	10	2.3 \pm 1.1	15	65.31	1	23	<0.0001
PCB (ppm)	0.35 \pm 0.03	10	5 \pm 2	15	92.74	1	23	<0.0001
Crabs								
Hg (ppm)	0.14 \pm 0.01	10	0.43 \pm 0.05	15	86.13	1	23	<0.0001
PCB (ppm)	0.33 \pm 0.06	10	1.7 \pm 0.3	15	65.36	1	23	< 0.0001
Clapper Rail Hatchlings								
Hg (ppm)	1.8 \pm 1.2	15	4.6 \pm 1.6	16	30.01	1	26	< 0.001
PCB (ppm)	28 \pm 19	15	222 \pm 213	16	12.38	1	28	0.001

^a Concentrations are reported in dry weight. SD is the standard deviation; df is degrees of freedom.

The relative amount of carbonate in bone mineral (minCO₃) was calculated as the ratio of the peak area for 1405 cm^{-1} (A1405; mainly carbonate type B substitution) to phosphate band area (A1200_900) and was calculated as follows:

$$\text{minCO}_3 = \text{A1405}/\text{A1200_900} \quad (2)$$

The crystallinity index (CI) (26) was calculated as the ratio between peak areas at 1030 cm^{-1} (highly crystalline apatite) to 1010 cm^{-1} (poorly crystalline apatite):

$$\text{CI} = \text{A1030}/\text{A1010} \quad (3)$$

Basic descriptive statistics were used to characterize bone properties. Analysis of variance (one-way ANOVA) was used to compare bone properties between the two populations to gain insights into the effects of contaminants on bone growth and metabolism. Pearson's correlation analysis and linear regression models were used to study relationships among the different properties of bone and the concentrations of toxicants in whole body analyses to determine how contaminants affect the chemical composition of bone. The level of significance chosen for all analyses was $P \leq 0.05$. Prior to these analyses, variables were tested for normality using Shapiro–Wilk statistics. All variables passed the normality test ($P > 0.05$) with the exception of Hg and PCB concentrations. After a log-transformation, these variables also had normal distributions. All statistical analyses were performed using the software package SPSS 12.0 (SPSS Inc.).

Results

Toxicants Levels at Blythe Island and LCP Site. Table 1 summarizes the toxicant levels reported in Cumbee (23) for

sediments, crabs (main food for Clapper Rail), and Clapper Rail hatchlings (used in this study) from the reference (Blythe Island) and contaminated site (LCP). These data show that Aroclor 1268 and Hg are at elevated levels in sediments and fauna in the contaminated marsh ecosystem, and at significantly higher concentrations than in the reference site. All contaminants found at LCP site were also detected at the reference site (though at significant lower levels), indicating that contaminants have migrated to nearby areas. Specifically, Hg and Aroclor 1268 levels in hatchlings are much higher than in sediments or food items, and comparable to those found in adult Clapper Rails (23). All these results show that toxicants are bioavailable and transferred from parents to offspring.

Bone Properties. Physical parameters and calculated peak areas are reported for leg bones in Table 2, along with the related ANOVA results. Neither the combined weight ($P = 0.891$) nor length ($P = 0.261$) of leg bones (femur + tibiae/fibulae) was significantly different between the two locations, however, important differences in the chemical composition of bones were detected. For instance, the Ca/P ratio was significantly greater in bones from the contaminated site than the reference site. Also, the relative amount of carbonate (minCO₃) and acid phosphate (HPO₄, estimated from a1118) in bone mineral were significantly lower in bones from the LCP site.

Correlation analyses for the chemical components of bone and whole body Hg and Aroclor 1268 concentrations are shown in Table 3. This information provides additional insights into processes that affect bone growth and metabolism. Concentrations of Hg and Aroclor 1268 were highly correlated indicating that these toxicants are associated. Additionally, some compositional parameters showed a

TABLE 2. Summary of Bone Property Values in Clapper Rail Hatchlings from Blythe Island and LCP Site

	Blythe Island		LCP site		ANOVA test			
	mean ± SD	N	mean ± SD	N	F	df1	df2	P
bone weight (g)	20 ± 7	20	20 ± 6	18	0.019	1	36	0.891
bone length (mm)	3.18 ± 0.33	19	3.02 ± 0.52	19	1.305	1	36	0.261
Ca/P	1.53 ± 0.05	16	1.58 ± 0.06	18	8.003	1	32	0.008
mineral	0.51 ± 0.11	20	0.55 ± 0.07	20	1.384	1	38	0.247
minCO3	0.13 ± 0.01	20	0.12 ± 0.01	20	6.208	1	38	0.017
crystallinity index	1.55 ± 0.20	20	1.54 ± 0.14	20	0.033	1	38	0.857
A1660	117 ± 9	20	117 ± 7	20	0.000	1	38	0.993
A1200_900	61 ± 12	20	65 ± 9	20	1.893	1	38	0.177
a953	0.06 ± 0.02	20	0.06 ± 0.01	20	0.321	1	38	0.574
a985	0.06 ± 0.02	20	0.06 ± 0.01	20	0.007	1	38	0.932
a1010	0.12 ± 0.01	20	0.12 ± 0.01	20	0.985	1	38	0.327
a1030	0.19 ± 0.02	20	0.19 ± 0.01	20	0.398	1	38	0.532
a1056	0.17 ± 0.01	20	0.18 ± 0.01	20	3.223	1	38	0.081
a1082	0.18 ± 0.01	20	0.18 ± 0.01	20	1.397	1	38	0.245
a1118	0.23 ± 0.03	20	0.22 ± 0.01	20	5.424	1	38	0.025

^a Values which were significantly different among two locations ($P < 0.05$) are highlighted in bold. SD is the standard deviation; df is degrees of freedom.

TABLE 3. Correlation Analyses for Different Bone Properties Determined in Clapper Rail Chicks and the Whole Body Load of Toxicants (Hg and PCB [Aroclor 1268]) in the Two Sites Studied^a

	Blythe Island						LCP site					
	log (Hg)			log (PCB)			log (Hg)			log (PCB)		
	R	P	N	R	P	N	R	P	N	R	P	N
log (Hg)	1						1					
log (PCB)	0.814	<0.001	15	1			0.717	0.002	16	1		
bone weight	-0.280	0.313	15	-0.321	0.244	15	0.037	0.900	14	0.347	0.224	14
bone length	-0.105	0.720	14	-0.160	0.584	14	0.514	0.050	15	0.409	0.130	15
Ca/P	0.303	0.338	12	0.321	0.309	12	-0.019	0.950	14	-0.081	0.784	14
mineral	0.273	0.325	15	0.175	0.534	15	0.139	0.608	16	0.175	0.517	16
minCO3	-0.403	0.137	15	-0.303	0.272	15	-0.133	0.624	16	-0.006	0.984	16
crystallinity index	0.334	0.223	15	0.305	0.269	15	0.548	0.028	16	0.697	0.003	16
A1660	-0.001	0.996	15	0.043	0.879	15	0.184	0.494	16	0.014	0.959	16
A1200_900	0.329	0.232	15	0.214	0.444	15	0.240	0.370	16	0.197	0.463	16
a953	0.359	0.189	15	0.420	0.119	15	-0.107	0.693	16	0.075	0.783	16
a985	-0.229	0.412	15	-0.208	0.457	15	-0.594	0.015	16	-0.731	0.001	16
a1010	-0.490	0.064	15	-0.418	0.121	15	-0.521	0.038	16	-0.699	0.003	16
a1030	0.056	0.843	15	0.070	0.805	15	0.349	0.185	16	0.397	0.128	16
a1056	0.316	0.251	15	0.226	0.417	15	0.655	0.006	16	0.711	0.002	16
a1082	0.132	0.640	15	-0.006	0.983	15	0.200	0.457	16	0.330	0.212	16
a1118	-0.197	0.482	15	-0.119	0.673	15	0.085	0.754	16	0.004	0.988	16

^a Properties and values of Pearson correlation coefficients (R) are at $P < 0.05$ are highlighted in bold. N is the number of observations.

significant correlation with toxicant levels at the contaminated site and none at the reference site. Specifically, at the contaminated site, the crystallinity index of bone was strongly and positively correlated to the Aroclor 1268 load of chicks ($R = 0.697$; $P < 0.003$; $N = 16$), indicating that exposure to Aroclor 1268 increased the crystallinity of bone mineral (Table 3; Figure 3a). This is in agreement with the positive correlation between some of the peak areas associated to highly crystalline phosphate (a1030, a1056) and Aroclor 1268 concentration and also with the negative correlation between the peak areas associated to poorly crystalline phosphate (a985 and a1010) and Aroclor 1268 concentration. Other changes related to contamination such as Ca/P ratio, minCO3, and HPO₄ content (a1118), which differed among sites, showed no statistically significant relationship to PCBs or Hg concentrations individually. Nevertheless, all observed changes and relationships are consistent and indicated that toxicants are inducing the formation of bone mineral with a composition characteristic of more mature bone (higher Ca/P, lower carbonate and acid phosphate content, increased crystallinity). The same relationships described for Aroclor

1268 were also observed for Hg for the same bone compositional parameters, though correlations with this metal were always lower than with Aroclor 1268 (Table 3). Additionally, a marginally significant correlation between bone length and Hg concentration was found at LCP site (Table 3). None of the previously described relationships were observed at the control site for either contaminant.

Discussion

This investigation is part of a larger ongoing study aimed to quantify the impact of contamination on the LCP superfund site using Clapper Rails as an indicator species of the health of this marsh ecosystem (23–25, 27). Previous studies, focused on Clapper Rail adults and hatchlings from LCP, indicated that toxicants present in the area have affected individuals at different levels compromising genetic (high incidence of DNA strand breakage in adults), reproductive (eggshell thinning), and hatchling (inability to stand, limb defects) health (23–25, 27). The current study on bone characteristics gives additional information on the effect of toxicants present at LCP on the overall health of Clapper Rail populations.

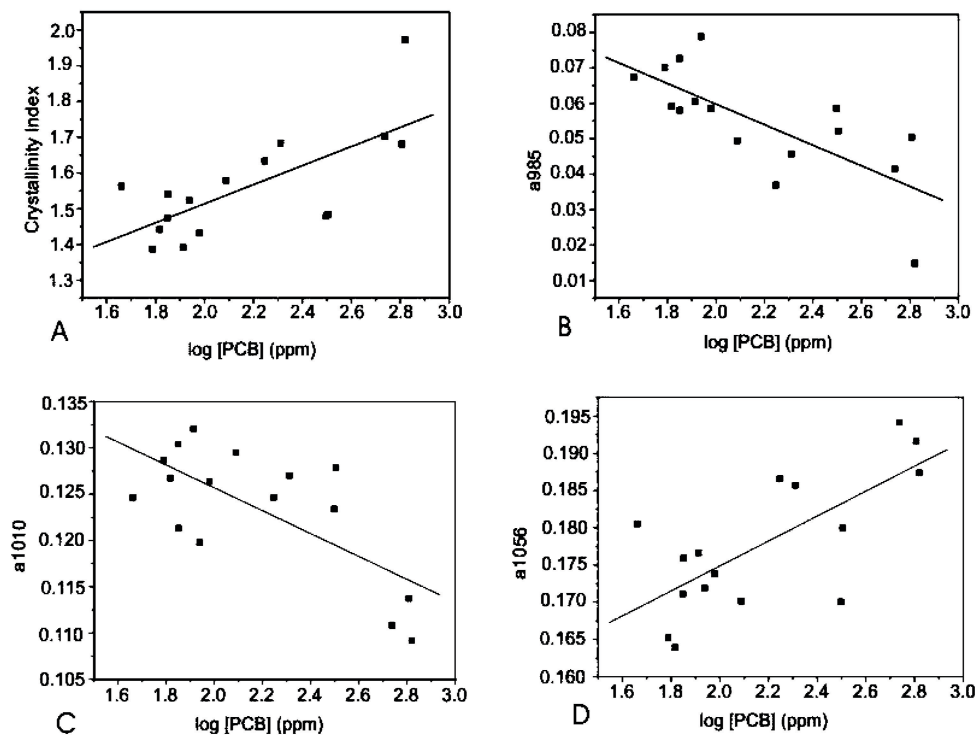


FIGURE 3. Relationships between bone composition and contaminant levels at the LCP site. (A) Crystallinity of bone mineral, estimated as the crystallinity index, increases with PCBs (Aroclor 1268) load. (B) Area of peak at 985 cm^{-1} associated with poorly crystalline phosphate decreases as PCBs load increases. (C) Area of peak at 1010 cm^{-1} associated with poorly crystalline phosphate decreases as PCBs load increases. (D) Area of peak at 1056 cm^{-1} associated with highly crystalline phosphate increases with PCBs load.

The main contaminants in the LCP marsh system, Aroclor 1268 and Hg, were at elevated levels in Clapper Rail hatchlings, well above the action levels of 2 and 1 ppm defined by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for PCBs and Hg, respectively, in fish as a food commodity (28, 29). Toxicant levels found in biota at LCP area have evolved over time. Reported levels of Hg for crabs were 0.94 ppm in 1971, 0.7 ppm in 1987, and 0.43 ppm in 2002 (16, 23). Hg levels for Clapper Rails in 1971 ranged from 2.0 to 9.5 ppm compared to 1.25 ppm in 1995, and 1.4 ppm in 2002, in muscle tissue (wet weight) (16, 19, 23). Reported values for PCBs in Clapper rail captured at LCP in 1995 were 24.5 ppm, and individuals captured in 2002 were 16 ppm in muscle tissue (wet weight) (19, 23). Thus, it seems that both Hg and PCBs levels have decreased overtime but levels are still very high. On the other hand, large variations in toxicant levels found in Clapper Rail hatchlings, especially for Aroclor 1268 at LCP, are probably due to spatially heterogeneous distribution of toxicants (17, 19, 23). In fact, Cumbee (23) showed that the adult Clapper Rails from LCP with the highest Aroclor 1268 levels also had the highest soil Aroclor 1268 levels in their home ranges. Cumbee's home range study was specifically designed to examine this potential phenomenon; however, it should be noted that the eggs collected for this study were not associated with those particular adults to avoid changing female behavior. Regardless, the sample size in that study is robust enough to infer that this would also be the case for the chicks used in this study.

The reference location (Blythe Island) was chosen to determine how ambient levels in the environment compare to those of the perturbed site (LCP site) and if contamination has affected the later. The reference location is representative of the biogeochemistry and physical geography of the focal site, but with toxicants being studied at background levels. One difficulty in choosing a reference site in any estuarine ecosystem is that is almost impossible to avoid all potential toxicants. In fact all the contaminants found at LCP were also detected at lower levels at the reference site and

throughout the estuaries in Brunswick (23), most likely transported through movement of silt and sediment from tidal flows. Congener formulation of Aroclor 1268 is quite uncommon, and its presence in the reference site can only be attributed as originating from LCP and can be considered as a marker of origin. The fact that contaminants found at LCP were also detected within the entire Brunswick estuary at lower levels supports the hypothesis that observed deleterious effects to our focal endpoints at the contaminated site were caused by the elevated levels of these contaminants.

Regarding the described effects on bone, it is difficult to know which specific toxicant(s) induced them, especially when they are associated (Hg and PCB co-varied) as in this study. Moreover, toxicant mixtures (e.g., toxicants that were not elevated in biota but present in the LCP system) may influence biokinetics. For instance, other organochlorines (e.g., dioxins) has been detected at significant levels at LCP system (30). Heavy metals, including Hg, are known to disrupt condrocyte metabolism reducing long bone development (11). Also, Hg affects calcium metabolism (4) and exposure to Hg may be manifested in bone mineral loss and osteoporosis or osteomalicia (8). Even though Clapper Rail hatchlings in the LCP system accumulated relatively high levels of Hg, we did not find any difference in length or degree of mineralization of leg bone compared to the control group. Since we did not observe these types of changes, we deduced that Hg levels could be too low to induce these effects. On the other hand, the main detectable effects of contamination on bone were an alteration of its chemical composition and crystallinity. Specifically, bone in the contaminated site had a higher Ca/P ratio, and lower carbonate and acid phosphate content. As described in the Introduction, these compositional changes are typically associated to bone maturation. Additionally, FTIR spectrometry data revealed a dose dependent change in the crystallinity of bone mineral which increased with toxicant levels. This is further confirmed by the observed increase of proportion of highly crystalline phosphate relative to poorly crystalline with toxicant levels.

All these observations indicated that contamination has accelerated bone maturation in Clapper Rail at LCP site. This could be due to a reduction in the rate of bone turnover caused by contaminants resulting in a higher amount of mature bone mineral relative to newer bone mineral. Also, a reduction in bone remodeling would reduce the availability of Ca for eggshell formation explaining the eggshell thinning observed in previous studies (24). Other authors (9, 10) have also associated an alteration of bone remodeling to PCBs exposure. Based on similarity of effects reported for PCBs and stronger correlations of bone compositional parameters with Aroclor 1268 loads, the observed changes can be attributed to a hormonal alteration of bone metabolism induced by exposure to PCBs. In any case, the altered composition and crystallinity is indicative of a pathological condition of bone (1, 2). Furthermore, to our knowledge, PCBs levels found in hatchling at LCP are higher than any reported value in eggs collected in other contaminated sites and well above levels for observable effects in laboratory tests in chicken embryos (14). Regardless, we cannot ignore the possibility of a cooperative effect of both Aroclor 1268 and Hg as well as other toxicants (e.g., dioxins) present at lower levels, although exploratory data analysis did not reveal any such associations.

In conclusion, these results indicate that bone in chicks from the contaminated site has matured more rapidly than in chicks from the reference site. This could be due to a reduction in the rate of bone turnover caused by an alteration of bone metabolism most probably caused by Aroclor 1268 or through a cooperative effect with Hg. Finally, in future studies, we will perform controlled dose experiments using Aroclor 1268 and/or Hg to further study the influence of these contaminants on bone metabolism. Also, the same methodology will be applied to quantify the environmental impacts of these or other contaminants on other ecosystems. Last, although this toxicological endpoint must come from sacrificed individuals, in cases such as those at LCP where chicks have toxicological abnormalities, it can advance the understanding of the evolutionary trajectory of effected populations and lend insight into the broader question of whether such systems are ecological traps.

Acknowledgments

This study has been financed by an award (DE-FC09-96-SR18546) from the U.S. Department of Energy to the University of Georgia, Savannah River Ecology Laboratory (SREL). We also thank financial support from the Spanish government through grant REN2003-07375 and Programa Ramon y Cajal. We thank Brian Jackson (SREL) for the chemical analysis of samples by ICP-MS, Jason Enelow for help with FTIR analyses, and James C. Cumbee Jr., and Warren L. Stephens, Jr. for egg collection and incubation. Finally, we would like to thank three anonymous referees for their useful comments and corrections.

Literature Cited

- Glimcher, M. J. (The nature of the mineral phase in bone: Biological and clinical implications. In *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*; Alvioli, L. V., Krane, S. M., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, 1998; pp 23–50.
- Boskey, A.; Mendelsohn, R. Infrared analysis of bone in health and disease. *J. Biomed. Opt.* **2005**, *10*, 031102-1–031102-9.
- Baxley, M. N.; Hood, R. D.; Vedel, G. C.; Harrison, W. P.; Szczech, G. M. Prenatal toxicity of orally administered sodium arsenite in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1981**, *26*, 749–756.
- Scheuhammer, A. M. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: A review. *Environ. Pollut.* **1987**, *46*, 263–295.
- Kanti, A.; Smith, M. A. Effects of heavy metals on chondrogenic differentiation of embryonic chick limb cells. *Toxicol. in Vitro* **1997**, *10*, 329–338.

- Andrews, J. E. Polychlorinated biphenyl (Arochlor 1254) induced changes in femur morphometry calcium metabolism and nephrotoxicity. *Toxicology* **1989**, *57*, 83–96.
- Lind, P. M.; Eriksen, E. F.; Sahlin, L.; Edlund, M.; Örborg, J. 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.* **1999**, *154*, 236–244.
- Jin, G. B.; Inoue, S.; Urano, T.; Cho, S.; Ouchi, Y.; Cyong, J. C. Induction of anti-metallothionein antibody and mercury treatment decreases bone mineral density in mice. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2002**, *185*, 98–110.
- Lee, L. L.; Lee, J. S. C.; Waldman, S. D.; Casper, R. F.; Grynepas, M. D. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model. *Bone* **2002**, *30*, 917–923.
- Lind, P. M.; Milnes, M. R.; Lundberg, R.; Bermudez, D.; Örborg, J.; Guillette, L. J., Jr. Abnormal bone composition in female juvenile American alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka, Florida). *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 359–362.
- Puzas, J. E.; Sichel, M. J.; Felter, M. E. Osteoblasts and chondrocytes are important target cells for the toxic effects of lead. *Neurotoxicology* **1992**, *13*, 783–788.
- Singh, S. U. N.; Casper, R. F.; Fritz, P. C.; Sukhu, B.; Ganss, B.; Girard, B., Jr.; Savouret, J. F.; Tenenbaum, H. C. Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J. Endocrinol.* **2000**, *167*, 183–195.
- Sonne, C.; Dietz, R.; Born, E. W.; Riget, F. F.; Kirkegaard, M.; Hyldstrup, L.; Letcher, R. J.; Muir, D. C. G. Is bone mineral composition disrupted by organochlorines in East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*)?. *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 1711–1716.
- Gould, J. C.; Cooper, K. R.; Scanes, C. G. Effect of polychlorinated biphenyls mixtures and three specific congeners on growth and circulating growth-related hormones. *Gen. Comput. Endocrinol.* **1997**, *106*, 221–230.
- Beland, P.; DeGuise, S.; Girard, C.; Lagace, A.; Martineau, D.; Michaud, R.; Muir, D. C. G.; Norstrom, R. J.; Pelletier, E.; Ray, S.; Shugart, L. R. Toxic compounds and health and reproductive effects in St. Lawrence beluga whales. *J. Great Lakes Res.* **1993**, *19*, 766–775.
- U.S. EPA. *Site Inspection Report, LCP Chemicals-Georgia Inc., Brunswick, Glynn County, Georgia*; United States Environmental Protection Agency, Waste Management Division: Washington, DC, 1990.
- Kannan, K.; Maruya, K. A.; Tanabe, S. Distribution and characterization of polychlorinated biphenyl congeners in soil and sediments from a superfund site contaminated with Aroclor 1268. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 1483–1488.
- Kannan, K.; Nakata, H.; Stafford, R.; Masson, G. R.; Tanabe, S.; Giesy, J. P. Bioaccumulation and toxic potential of extremely hydrophobic polychlorinated biphenyl congeners in biota collected at a superfund site contaminated with Aroclor 1268. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 1214–1221.
- Sprenger, M. D.; Finley, N. J.; Huston, M. *Ecological assessment, ecological risk evaluation of the salt marsh and adjacent areas at the LCP superfund site, Brunswick GA*, MAS 0000300; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 1997.
- Gaines, K. F.; Cumbee, J. C., Jr.; Stephens, W. L., Jr. Nest characteristics of the clapper rail in coastal Georgia. *J. Field Ornithol.* **2003**, *74*, 152–156.
- Terres, J. K. *The Audubon Society Encyclopedia of North American Birds*; Wings Books: NJ, 1991; p 1109.
- Eddleman, W. R.; Conway, C. J. Clapper Rail (*Rallus longirostris*). In *The birds of North America*, no. 340; Poole, A.; Gill, F., Eds.; The Birds of North America, Inc.: Philadelphia, PA, 1998.
- Cumbee, J. C., Jr. Quantifying trophic transfer of mercury and Aroclor 1268 to clapper rails (*Rallus longirostris*) in a contaminated ecosystem using spatially explicit sampling methods. MSc Thesis, The University of Georgia, 2003.
- Rodriguez-Navarro, A. B.; Gaines, K. F.; Romanek, C. S.; Masson, G. R. Mineralization of Clapper Rail eggshell from a contaminated salt marsh system. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**, *43*, 449–460.
- Novak, J. M.; Gaines, K. F.; Cumbee, J. C., Jr.; Mills, G. L.; Rodriguez-Navarro, A.; Romanek, C. S. Clapper Rails as Indicator Species of Estuarine Marsh Health. *Stud. Avian Biol.* (in press).
- Miller, L. M.; Vairavamurthy, V.; Chance, M. R.; Mendelsohn, R.; Paschalis, E. P.; Betts, F.; Boskey, A. L. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-

- spectroscopy of the ν_4 PO₄⁻ vibration. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1527*, 11–19.
- (27) Gaines, K. F.; Novak, J. M.; Stephens, W. L., Jr.; Cumbee, J. C., Jr. Determination of Contaminant Burdens, DNA Strand Breakage and Nesting Success in Clapper Rails Inhabiting the Salt Marsh Estuary in Brunswick, GA—PART I & II. In *Report to the U.S. Fish and Wildlife Service*; U.S. Fish and Wildlife Service: U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2000.
- (28) Tolerances for polychlorinated biphenyls (PCB's). *Code of Federal Regulations*, Section 30, Part 109, 1998.
- (29) *Fish, Shellfish, Crustaceans and Other Aquatic Animals—Fresh, Frozen, or Processed—Methyl Mercury*; (CPG 7108.07). Sec. 540.600 (rev 3/95). Compliance Policy Guides. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Washington, DC, 1996.
- (30) Kannan, K.; Watanabe, S.; Giesy, J. P. Congener profile of polychlorinated/brominated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in soil and sediments collected at a former chlor-alkali plant. *Toxicol. Environ. Chem.* **1998**, *67*, 135–167.

Received for review March 31, 2006. Revised manuscript received June 13, 2006. Accepted June 13, 2006.

ES060769X

Manuscript II

LONG-TERM EFFECTS OF LEAD POISONING ON BONE MINERALIZATION IN VULTURES EXPOSED TO AMMUNITION SOURCES

Laura GANGOSO¹, Pedro ÁLVAREZ-LLORET², Alejandro B. RODRÍGUEZ-NAVARRO², Rafael MATEO³, Fernando HIRALDO¹, José Antonio DONÁZAR¹

1. *Dept of Conservation Biology, Estación Biológica de Doñana, C.S.I.C., Avda M^a Luisa s/n, 41013 Sevilla, Spain.*

2. *Dept of Mineralogy and Petrology, University of Granada, Avda Fuentenueva s/n, 18002 Granada, Spain*

3. *Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (CSIC, UCLM, JCCM), Ronda de Toledo s/n, 13071 Ciudad Real, Spain*

ENVIRONMENTAL POLLUTION (In press)

ABSTRACT

Long-lived species are particularly susceptible to bioaccumulation of lead in bone tissues. In this paper we gain insights into the sublethal effects of lead contamination on Egyptian vultures (*Neophron percnopterus*). Our approach was done on the comparison of two populations (Canary Islands and Iberian Peninsula) differing in exposures to the ingestion of lead ammunition. Blood lead levels were higher in the island population (Canary Islands range: 5.10-1780 $\mu\text{g L}^{-1}$ $n=137$; Iberian Peninsula range: 5.60-217.30 $\mu\text{g L}^{-1}$ $n=32$) showing clear seasonal trends, peaking during the hunting season. Moreover, males were more susceptible to lead accumulation than females. Bone lead concentration increased with age, reflecting a bioaccumulation effect. The bone composition was significantly altered by this contaminant: the mineralization degree decreased as lead concentration levels increased. These results demonstrate the existence of long-term effects of lead poisoning which may be of importance in the declines of threatened populations of long-lived species exposed to this contaminant.

Keywords: bioaccumulation, bone mineralization, Egyptian vulture, FTIR, lead shot.

INTRODUCTION

Lead is a highly toxic heavy metal which can be released into the environment via numerous routes, but principally by industrial, mining and hunting activities (Fisher et al., 2006). The diffusion into the environment of lead produced by human activities has historically been shown to affect wildlife (Depledge et al., 1993; Eens et al., 1999). Nevertheless, the restrictions implemented over the last few decades have resulted in the current situation where contaminating sources, particularly those from industrial activities in developed countries are very limited. Consequently, the contamination deriving from hunting activities has increased in relative importance in recent decades (Fisher et al., 2006). Ingestion of lead shot and bullet fragments is currently the principal source of lead poisoning for numerous vertebrate species, primarily birds (Bellrose, 1959; Clark and Scheuhammer, 2003; Mateo, 1998; Pain et al., 2005; Pattee and Hennes, 1983; Redig et al., 1980).

Individual effects of lead poisoning in wild vertebrates have been repeatedly highlighted. Acute poisoning (exposure to a high concentration during a short time period) can lead to death (Mateo et al., 1998; Ramo et al., 1992), while chronic exposure (prolonged exposure at lower concentrations) can have sublethal effects which affect reproductive success (Buerger et al., 1986), behaviour (Scheuhammer, 1987), immune response (Redig et al., 1991; Snoeijs et al., 2004) and physiology (Burger, 1995; Fair and Ricklefs, 2002). However, the majority of the studies have limited their scope to descriptive aspects or are based on experimental treatments under controlled laboratory conditions; in consequence, few studies have treated this problem in depth in populations of wild vertebrates (Mateo et al., 1999; Pain et al., 2005).

Bones are a long-term repository for lead, containing approximately 90% of the total body burden in mammals and birds (Ethier et al., 2007). The Pb²⁺ ion readily replaces the Ca²⁺ ion (Ehle, 1993; Scheuhammer, 1987) additionally altering the hormonal regulation of the calcium and the osteoblast function (Pounds et al., 1991; Ronis et al., 2001). This leads to long-term detrimental effects which have regularly been demonstrated in clinical studies on mammals, and fundamentally in humans (Cheng et al., 2001; Latorre et al., 2003; Pounds et al., 1991). Nevertheless, very little information exists on the effects that the substitution of calcium by lead in bone tissue and its consequences in processes such as the mineralization and the alteration of compositional properties and bone mechanics may have (Bjorå et al., 2001; Gruber et al., 1997; Hamilton and O'Flaherty, 1995; Pain et al., 2007). It is foreseeable that these effects could be particularly severe for long-lived vertebrates, whose life-history traits make them prone to lead bioaccumulation over time. Thus, long-term effects of lead poisoning could play an until now unknown role threatening some populations and species of large birds of prey such as the Bald Eagle (*Haliaeetus leucocephalus*), Steller's Sea Eagle (*H. pelagicus*), White-tailed Sea Eagle (*H. albicilla*) and the critically endangered Californian Condor (*Gymnogyps californianus*) which are all known to be affected by lead ammunition sources (Behrens and Brooks, 2000; Church et al., 2006; Franson, 1996; Kenntner et al., 2001; Meretsky et al., 2000).

In this paper we gain insights into the sublethal effects of lead contamination on long-lived vertebrates. We studied the Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus*), a small vulture considered as globally endangered (IUCN, 2007) whose most important populations in the Western Palearctic remain in Spain (Donázar, 1993, 2004; Perea et al., 1990). Some Spanish populations of this species have been monitored from the eighties until present, providing an adequate data source for the

objectives proposed (Donázar, 1993; Donázar et al., 1996, 2002). Our approach is based on the comparison of two populations, one resident on islands (Canary Islands) and the other a migratory continental one (Iberian Peninsula) which are potentially differentially affected by this contaminant (see Donázar et al., 2002). Our first hypothesis is that the island population, being resident, suffers higher exposure than the migratory continental one to the ingestion of lead shot during the winter hunting season. Consequently we can predict that a) we should find a higher frequency of lead shot in regurgitated pellets and of acute-type poisoning shown by blood analysis. As a corollary of the former prediction, b) in the island population we should find a seasonal pattern with higher lead blood levels during the hunting season. Our next hypothesis is that the contamination has long-term effects on individuals. Given that the bone lead level reflects life time exposure, we predict that c) the Canary Islands Egyptian Vultures will show higher contaminant levels in this tissue, and d) there will be an effect of bioaccumulation with age. Finally, we expect to find negative effects on the affected individuals, such that e) a negative relationship will exist between lead concentration and compositional properties of the bone tissue.

MATERIAL AND METHODS

Area and study populations

We analysed samples of Egyptian Vultures from Fuerteventura, Canary Islands (30 breeding pairs; 1 662 Km²) and from the Iberian Peninsula. Within the latter area, individuals from Cádiz (30 b.p.; 9 500 Km²), the Ebro valley (100 b.p.; 19 000 Km²) and Segovia (25 b.p.; 5 000 km²) were included. Throughout its distribution, Egyptian Vultures usually consume livestock carcasses in “vulture restaurants”, but also scavenge heavily on wild prey (mainly rabbit *Oryctolagus cuniculus* and pigeon *Columba* spp. carcasses). In Iberia, garbage dumps also provide an

important fraction of their trophic needs (see Donázar, 1993; Donázar et al., 2002). The Iberian populations remain in their distinct breeding areas between March and September and so consequently their presence does not overlap with the hunting season in Spain, which used to begin at the end of the summer, finishing in January-February before the arrival of the transaharan migrants (Cramp and Simmons, 1980; Del Hoyo et al., 1994). In Fuerteventura, the Egyptian Vultures are sedentary, and so are also present on the breeding grounds during the hunting season (August-November).

Field procedures

To determine the incidence of lead shot ingestion in the mainland population and compare it with that previously observed in the island one (see Donázar et al., 2002), we collected 327 regurgitated pellets at the communal roosts used by the species in the Ebro valley from 1999-2003. We determined the presence of ingested shot by X-rays. Pellets apparently containing shot were subsequently dissected to confirm the presence of lead.

From 1999-2005, we obtained 137 blood samples of Egyptian Vultures on the Canary Islands, both from fledglings ($n = 61$) and individuals of other ages trapped during cannon-netting ($n = 76$). In addition, we obtained 32 samples of immature and adult mainland birds (10 individuals in the Ebro valley in 2002, 19 in Segovia in 2003-2004 and three in Cádiz in 2003). The birds' ages were determined using plumage characteristics (Forsman, 1998) as 1= fledglings, 2= individuals of 1-2 years old, 3= 2-3 years, 4= 3-4 years, 5= 4-5 years (adults) and 6= individuals ≥ 5 years old). We extracted a small quantity of blood (1 ml) from each individual from the brachial vein. It was placed in a tube containing lithium-heparin and immediately frozen at -20°C .

We extracted bone tissue samples from 39 Egyptian Vulture carcasses (28 from the Canary Islands and 11 from the Iberian Peninsula), all found dead in the field between 1999 and 2004. The age of 16 of the island birds and all of the continental birds was known. Age and sex was known for 14 island birds and five continental birds. We extracted the humerus of each individual, which was measured and weighed after meticulous clearing of all muscle material with a scalpel (right humerus 66.7% of cases, left humerus 33.3%). The humerus has frequently been used in studies monitoring the exposure of birds to lead (Ethier et al., 2007). As a pneumatic bone with little haemopoietic activity (Schepelmann, 1990), it may be less likely to be affected by acute exposures due to the absence of the bone marrow and as a result more reliably reflect chronic exposure to lead. Moreover, lead concentrations in the humerus are similar to and highly correlated with those of other long bones such as the femur (Mateo et al., 2003). We obtained from each humerus a fragment approximately 2 cm long from the diaphysis. We washed the sections obtained repeatedly in distilled water to remove any possible traces resulting from the dissection and cutting processes. Finally, we grounded the samples with a cryogenic mill (Freezer/Mill, SPEX) for later analysis.

Laboratory analyses

Recent exposure

We determined the blood lead concentration using atomic absorption spectrophotometry in graphite furnace (GF-AAS) (AAAnalyst 800, Perkin Elmer) following the procedure described in Mateo et al. (1999). Lead concentrations in $\mu\text{g/L}$ are the result of the average of 3 replicates. Additionally, we triple processed a bovine blood sample CRM 196 with an average (SD) of 772 (11) $\mu\text{g L}^{-1}$, giving a result of 767 (8) $\mu\text{g L}^{-1}$, with an RSD of 1.04%. In compliance with the rules of use, the result is acceptable as it falls within the value of the average \pm 2SD (of 95% of the

laboratories which have participated in the analysis of the certified sample). The detection limit for lead was $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. We interpreted blood lead levels as background ($<200 \mu\text{g L}^{-1}$), subclinical ($200\text{-}1\ 000 \mu\text{g L}^{-1}$) and toxic levels ($\geq 1\ 000 \mu\text{g L}^{-1}$) as reviewed by Franson (1996) for Falconiformes.

Chronic exposure

We analyzed the lead content in the bones using inductively coupled plasma with optical emission spectrophotometry (ICP-OES, Perkin-Elmer Optima 5100 DV) and GF-AAS. The sample, 50 mg of ground bone, was digested with 1 ml of 70% nitric acid (HNO_3) and 1 ml of 30% nitrogen peroxide (H_2O_2) in a microwave oven and finally diluted with ultrapure water to give a 10 ml sample. Bone lead levels were interpreted as background ($<10 \mu\text{g g}^{-1}$) or abnormal exposure ($\geq 10 \mu\text{g g}^{-1}$) according to the data reviewed by Mateo et al. (2003).

We investigated the effect of lead contamination on bone mineralization by means of Fourier transformed infrared spectrometry (FTIR), normally used to analyse bone chemical composition (Miller et al., 2001; Ou-Yang et al., 2001; Rey et al., 1991; Smith and Rehman, 1995). We undertook it by mixing and homogenizing 5 mg of powdered bone sample with 90 mg of KBr. The tablets were prepared under a pressure of 10 metric Tons for 10 minutes. We registered the infrared spectra on a Magna IR200 Nicolet FTIR spectrometer. The spectra were acquired in the absorption mode between 400 cm^{-1} and $4\ 000 \text{ cm}^{-1}$, with a resolution of 2 cm^{-1} and a total of 128 scans per sample. A reference tablet (95 mg of BrK) was used for background correction.

We determined the organic and mineral material content of the bone samples measuring the area of the absorption bands associated with

molecular groups of carbonate, phosphate, amide and C-H aliphatic in the infrared spectrum. We undertook the band analyses and deconvolution of peaks using the computer programs EZ-OMNIC® and PeakFIT®. The deconvolution of overlapping peaks was resolved using a second derivative method. This method allows a more accurate and more detailed quantitative analysis of the spectrum. A detailed description of the methodology employed is described elsewhere (Rodriguez-Navarro et al., 2006). We calculated the degree of mineralization of the bone as:

$$\text{Mineralization degree (\%)} = \frac{\text{phosphate mineral (} \nu_3\text{PO}_4 \text{ - band area } 900\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}\text{)}}{\text{collagen (amide I - band area } 1660 \text{ cm}^{-1}\text{)}}$$

Statistical analyses

Lead concentrations, both in blood and bone samples were not normally distributed (Shapiro-Wilk, $p < 0.001$), so were normalized through logarithmic transformation in both cases. We compared the percentage of pellets containing lead shot between the island and continental populations by a Chi-test. We tested differences in blood lead concentrations between the populations through a T test for independent samples. We determined the relation between blood lead levels and hunting activity in the island population using a univariate analysis of variance with the lead concentration as the response variable. We included the capture date: during the hunting season (1) or outside it (0); the sex: female (1) or male (2); and the age of the individuals (1-6, see above for definition of age categories) as model factors. The possible interactions were considered in the model.

We analysed the possible differences in bone lead concentrations between the populations by means of an analysis of the variance (ANOVA) considering all individuals combined. We included

population: Canary Islands (1) or Iberian Peninsula (0); the sex: female (1), male (2) and the age (1-6) as factors. Secondly, we undertook a similar ANOVA analysis but only using adult individuals (≥ 5 years). We investigated the existence of a bioaccumulation effect through a univariate analysis of variance, considering the bone lead concentration as the response variable. The factors corresponding to age (1-6) and sex, as well as their possible interactions were considered in the model. We analysed the effect of age on the bone lead concentration only for the island population, given that all the continental individuals of known age, except for one, were adults ($n = 10$). Subsequently, we examined the relationship between bone lead concentrations and age through a Pearson correlation (one-tailed test).

We analysed the relationships between the degree of bone mineralization with the individual and population characteristics through a univariate analysis of variance, including population, sex and age as factors. The lead concentration was included as a covariate. Finally, we analysed the effect of lead on the compositional properties of the bone (degree of mineralization) through a Pearson correlation (one-tailed test).

RESULTS

Lead intoxication in relation to geographical and seasonal patterns of hunting activities

We found no lead shot in the continental pellets examined ($n = 327$), which was significantly different ($\chi^2 = 14.9$, $DF = 1$, $p = 0.01$) from that found in a previous study carried out in the Canary Islands, where 5% of the pellets examined contained lead shot ($n = 424$; Donázar et al., 2002).

Although the mean blood lead concentration was significantly higher in the continental population: T test for unequal variances $t = 2.50$, $DF =$

66.56, $p = 0.01$, 95% CI = 0.03-0.30 (Lavene test of variance equality $F = 5.43$, $p = 0.021$), both populations presented different distributions of blood lead concentrations (Fig.1). This different distribution stems from the fact that only one individual from the mainland population presented a concentration indicative of abnormal exposure ($217.30 \mu\text{g L}^{-1}$), whereas in the island population 10 individuals (7.30 %) showed subclinical levels above $200 \mu\text{g L}^{-1}$, and three of these (2.19 %) showed blood lead levels of over $500 \mu\text{g L}^{-1}$. One of these birds, captured in 2000 and which subsequently disappeared, showed a concentration of $1\,780 \mu\text{g L}^{-1}$, considered to be a toxic level birds of prey (Franson, 1996).

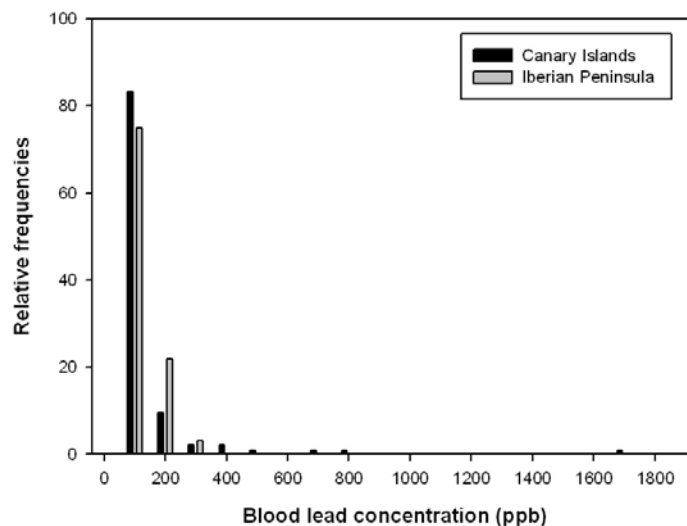


Figure 1. Distribution of blood lead concentrations (ppb= $\mu\text{g/L}$) in the mainland (N=32) and the island (N=137) populations of Egyptian vulture.

Blood lead levels were significantly higher in the island population during the hunting season (geometric mean = 93.33, 95% CI = 70.79-123.03, $n = 47$) than outside it (geometric mean = 28.84, 95% CI = 24.55-34.67, $n = 90$) ($F_{1,132} = 62.66$, $p < 0.001$), and differed marginally between the sexes ($F_{1,132} = 3.08$, $p = 0.08$) being higher in males (geometric mean = 44.67, 95% CI = 33.11, $n = 57$) than for females (geometric mean = 41.69,

95% CI = 33.11-51.29, $n = 79$). In addition, an interaction was apparent: males during the hunting season showed the highest levels of lead ($F_{1, 132} = 8.32, p = 0.005$). Age and its possible interactions showed no significant effect ($p > 0.05$ in all cases).

Lead accumulation in bone and its consequences on mineralization

Only one individual three years old from the island population showed bone lead levels $>20 \mu\text{g g}^{-1}$, considered to indicate excessive exposure and absorption of Pb at some stage. Moreover, Pb concentrations $>20\text{--}30 \mu\text{g g}^{-1}$ are often found in birds that have died of Pb poisoning (Pain et al., 2007).

When all age classes were considered, bone lead levels did not differ significantly between the continent (geometric mean = 6.17, 95% CI = 4.27-8.91, $n = 11$) and the island (geometric mean = 7.42, 95% CI = 5.25-8.91, $n = 28$) (ANOVA, $F_{1, 37} = 0.21, p = 0.65$). However, bone lead levels increased with age (ANOVA, $F_{5, 22} = 4.85, p = 0.004$). Considering only adult birds (≥ 5 years), the lead concentration was significantly higher for the island population (geometric mean = 8.13, 95% CI = 6.03-10.72, $n = 11$) than for the mainland one (geometric mean = 5.49, 95% CI = 4.07-7.41, $n = 10$) (ANOVA, $F_{1, 19} = 4.5, p = 0.04$). Sex showed no significant effect in any of the analyses.

We found a bioaccumulation effect of bone lead with age in the island population (ANOVA $F_{5, 11} = 4.418, p = 0.019, n = 17$) (Fig. 2). The correlation between the variables was positive (Pearson $r = 0.54, p = 0.013, n = 17$).

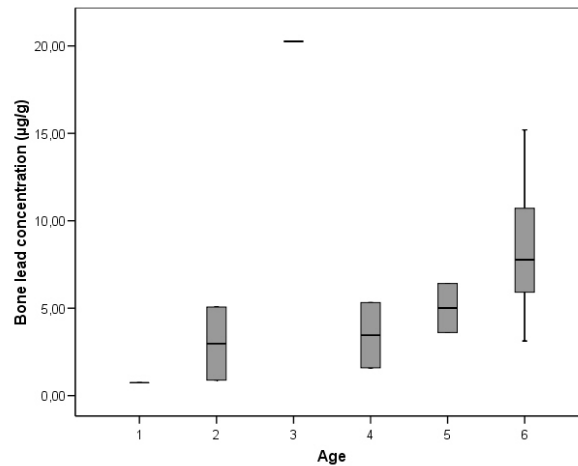


Figure 3. Bioaccumulation effect of bone lead with age in the island population of Egyptian vultures.

Age or sex had no significant effects on the degree of bone mineralization. However, the degree of mineralization was negatively correlated with the bone lead concentration when we combined all data from both populations (Pearson $r = -0.30$, $p = 0.032$, $n = 39$). This correlation was even stronger when considering only adult birds (Pearson $r = -0.63$, $p = 0.001$, $n = 20$) (Fig. 3).

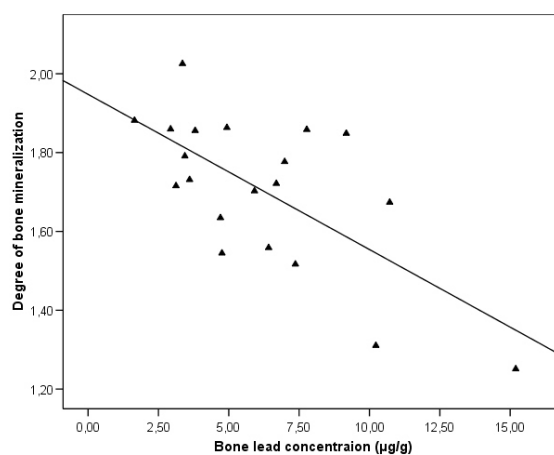


Figure 3. Negative relation between bone lead ($\mu\text{g/g}$) and degree of bone mineralization in adult Egyptian vultures (≥ 5 years old) from the island and mainland populations (fit line $R^2 = 0.45$ is showed).

DISCUSSION

Our study demonstrates that ingestion of lead ammunition is related to the accumulation of lead in bones of Egyptian Vultures. It ultimately affected the degree of bone mineralization, this being lowest in those birds with highest bone lead concentrations. Numerous studies indicate that heavy metals, and in particular lead, can affect the correct mineralization of the bone (Gruber et al., 1997; Hamilton and O'Flaherty, 1995), directly or indirectly altering the renewal rate by affecting osteoblasts and osteoclasts activity (Berglund et al., 2000; Carmouche et al., 2005; Kanti and Smith, 1997; Puzas et al., 1992) and playing an important role in the development of bone pathologies (Bjorå et al., 2001; Smits et al., 2005; Puzas, 2000). However, the relationship between bone lead and mineralization has never before been described in wild populations (but see Bjorå et al., 2001), even though it is reasonable to consider it is a logical consequence of repeated lead ingestion and accumulation in long-lived species. The reduction in bone mineralization could mean an increase in bone fragility (Fleming et al., 2000; Whitehead and Fleming 2000). Indeed, in the island population of Egyptian Vulture an unusually high level of frequency of fractures and even leg amputations has been recorded (8% until 2007, $n = 150$) while this situation has not been detected in the mainland population ($n > 2\ 000$, authors, unpublished data). Although on occasions these fractures are derived from entanglement on ground wire stabilizers (Gangoso and Palacios, 2002), very probably, these fractures may be facilitated by a greater bone fragility (Bjorå et al., 2001; Smits et al., 2005).

The ecology of the island population makes it particularly susceptible to poisoning from ammunition sources. The sedentary nature of the island birds leads to a higher probability of ingestion of lead shot as compared to the mainland population, since they coincide with the hunting season

on the island. This appears to be supported given that the blood lead levels found in birds from the Canary Islands were much higher during the hunting season than outside it. The volcanic origin of the island makes the recovery of wounded game such as wild rabbits and Barbary Partridges (*Alectoris barbara*) extremely difficult. In addition, certain introduced species and of little hunting interest, such as feral pigeons (*Columba livia*) and barbary ground squirrels (*Atlantoxerus getulus*) are habitually shot but not retrieved, with the subsequent risk of them being ingested by scavengers (Knopper et al., 2006). In addition, the frequency of individuals in the island population with blood lead levels indicative of abnormal Pb exposure ($>200 \mu\text{g/L}$; Franson, 1996) was higher than that of mainland birds which are less exposed to the chance of consuming shot animals. However, the mainland populations were not free of the poisoning risk, given the frequency of individuals with blood lead levels of $<200 \mu\text{g L}^{-1}$. Although the Iberian Egyptian vultures are not present in Spain during the main hunting season, they are exposed to short hunting periods which takes place in August-September, as well as the ingestion of hunted game from shot at but not killed or crippled game from the previous hunting season. Besides, as found in other bird species, other localised contaminant sources could be operating, such as industrial activity or the ingestion of contaminated materials in rubbish tips where mainland Egyptian vultures feed regularly (Donázar et al., 1996; Blanco et al., 2004; Smits et al., 2005).

Male Egyptian Vultures were significantly more affected by lead contamination during the hunting season, which could be related to sexual differences in the food searching behaviour, a phenomenon described in dimorphic raptors where spatial segregation or food niche partitioning is seen (Hedrick and Temeles, 1989; Lee and Severinghaus, 2004). Indeed, our data indicate that females concentrate on Fuerteventura

at predictable food sources (“vulture restaurants”) while males search for more prey but which are less predictable spatially (authors, unpublished data). Likewise, bioaccumulation of lead in animal tissues is a highly sex-linked process, given that the forms of ingesting and excreting the contaminant could differ notably between males and females (Tejedor and González, 1992).

The consequences at the population level from lead poisoning remain to be determined. As noted above, it is reasonable to assume that the probability of bone fracture is increased given alterations in the bone mineralization process, which undoubtedly lowers survival rates and / or at least the effective population size, given that no live individuals with apparent fractures has bred in the island population studied (authors, unpublished data). The island vultures also have a very low productivity rate (0.5 chicks/pair/year, Donázar et al., 2002) and it seems reasonable to consider that the lead could be playing an important role in this, especially given that the lead accumulated in the bones of the females is mobilised during eggshell formation (Taylor, 1970) and transmitted to both the eggshell and to the embryo (Edens and Garlich, 1983; Grandjean, 1976; Pattee, 1984). Moreover, lead may affect sperm quality and consequently the fertilization rate (Benoff et al., 2000; Castellanos et al., in press). Additionally, it has hypothesised that the accumulation of toxins at subclinical levels could be the cause of immunosuppression, which increases susceptibility to infectious diseases (Blanco et al., 2004; Daszak et al., 2001; Dobson and Foufopoulos, 2001; Snoeijs et al., 2004). In the island Egyptian Vulture population we find they show poor immunocompetence and a comparatively higher susceptibility to pathogen incidence (Gangoso, 2006), which, although it could have its origin in multiple causes, given the results of the contaminants analyses

leads us to suspect that some form of interaction between these factors should exist.

Summarizing, our study demonstrates that a population of long-lived vertebrates, in this case an avian scavenger, exposed to the ingestion of lead shot can be affected over the long term by the bioaccumulation of this heavy metal in the bone tissue through a loss of mineralization. The ultimate consequences of poisoning by lead can be readily underestimated given that the sublethal effects are difficult to detect and may only show over a very long time period and in combination with other factors (Franson et al., 1983; Mateo et al., 1997; Rocke and Samuel, 1991; Smits et al., 2007). Regular monitoring based on blood analyses from regular field sampling is consequently important to reveal recent exposure to lead, but provides no information regarding the duration of exposure, and, if it doesn't cause the death of the individual, even less information on the long term effects on the organism (Fry, 2003). Without doubt, the hidden effects such as those revealed in this study, may be acting as the limiting factors in relation to the decline and recovery of populations of long-lived vertebrates exposed to lead poisoning (Fry, 2003; Pattee et al., 1990).

CONCLUSIONS

We analyzed the long term effects of lead poisoning in two populations of Egyptian vultures (insular vs. mainland). The ecological context of the insular population determined an elevated exposition to lead shot, and consequently, higher levels of blood and bone lead than the mainland one. Moreover, blood lead levels were higher during the hunting season in the island population, especially for males. In addition, we found a clear effect of bioaccumulation of bone lead with age. The main conclusion drawn is that lead causes a reduction in bone mineralization.

These hidden effects of lead poisoning may be of importance in the declines of threatened populations of long-lived species exposed to this contaminant.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Consejería de Medio Ambiente del Cabildo Insular de Fuerteventura, the Viceconsejería de Medio Ambiente del Gobierno de Canarias, and the Projects REN 2000-1556 GLO and CGL2004-00270/BOS funded this research. We also thank financial support from the Spanish government through grant REN2003-07375.

REFERENCES

Behrens, J., Brooks, J., 2000. Wind in their wings: The condor recovery program. *Endangered Species Bulletin* 25, 8–9.

Bellrose, F., 1959. Lead poisoning as a mortality factor in waterfowl populations. *Illinois Natural History Survey Bulletin* 27, 235–288.

Benoff, S., Jacob, A., Hurley, I.R., 2000. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Human Reproduction Update* 6, 107–121.

Berglund, M., Akesson, A., Bjellerup, P., Vahter, M., 2000. Metal–bone interactions. *Toxicology Letters* 112–113, 219–225. doi:10.1016/S0378-4274(99)00272-6

Bjørå, R., Falch, J.A., Staaland, H., Nordsletten, L., Gjengedal, E., 2001. Osteoporosis in the norwegian moose. *Bone* 29, 70–73. doi:10.1016/S8756-3282(01)00469-0

Blanco, G., Jimenez, B., Frias, O., Millan, J., Davila, J. A., 2004. Contamination with nonessential metals from a solid-waste incinerator correlates with nutritional and immunological stress in prefledgling black kites (*Milvus migrans*). *Environmental Research* 94, 94–101.

Buerger, T.T., Mirarchi, R.E., Lisano, M.E., 1986. Effects of lead shot ingestion on captive mourning dove survivability and reproduction. *Journal of Wildlife Management* 50, 1–8.

Burger, J., 1995. A risk assessment for lead in birds. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 45, 369–396.

Castellanos, P., Mateo, R., Reglero, M.M., Estesó, M.C., Fernández-Santos, M.R., Garde, J.J. In press. In vitro effects of lead on fatty acid composition, oxidative stress biomarkers and quality of ram spermatozoa. *Toxicological and Environmental Chemistry*.

Carmouche, J.J., Puzas, J.E., Zhang, X., Tiyapatanaputi, P., Cory-Slechta, D.A., Gelein, R., Zuscik, M., Rosier, R.N., Boyce, B.F., Keefe, R.J.O., Schwarz, E.M., 2005. Lead exposure inhibits fracture healing and is associated with increased chondrogenesis, delay in cartilage mineralization, and a decrease in osteoprogenitor frequency. *Environmental Health Perspectives* 113, 749–755. doi: 10.1289/ehp.7596.

Cheng, Y., Schwartz, J., Sparrow, D., Aro, A., Weiss, S.T., Hu, H., 2001. Bone lead and blood lead levels in relation to baseline blood pressure and the prospective development of hypertension the normative aging study. *American Journal of Epidemiology* 153, 164–171.

Church, M.E., Gwiazda, R., Risebrough, R.W., Sorenson, K., Chamberlain, C.P., Farry, S., Heinrich, W., Rideout, B.A., Smith, D.R., 2006. Ammunition is the Principal Source of Lead Accumulated by California Condors Re-Introduced to the Wild. *Environmental science and Technology*.

Clark, A.J., Scheuhammer, A.M., 2003. Lead poisoning in upland foraging birds of prey in Canada. *Ecotoxicology* 12, 23–30.

Cramp, S., Simmons, K.E.L., 1980. The birds of the Western Palearctic. Vol. II. Oxford University Press, Oxford.

Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2001 Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica* 78, 103–116.

Del Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J., 1994. Handbook of the birds of the world. Vol. II. Lynx Editions, Barcelona, España.

Depledge, M., Weeks, J., Bjerregaard, P., 1993. Heavy metals. In: Calow, P. (Ed.), *Handbook of Ecotoxicology*, Vol 1. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 79–105.

Dobson, A., Foufopoulos, J., 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 356, 1001–1002.

Donázar, J.A., 1993. Los buitres ibéricos: biología y conservación. Reyero, J.M. (Ed.), Madrid, España.

Donázar, J.A., 2004. Alimoche común *Neophron percnopterus*. In: Madroño, A., González, C., Atienza, J.C. (Eds.), Libro Rojo de las Aves de España. Dirección General para la Biodiversidad-SEO/BirdLife, Madrid, pp. 129-131.

Donázar, J.A., Ceballos, O., Tella J.L., 1996. Communal roosts of egyptian vultures (*Neophron percnopterus*): dynamics and implications for the species conservation. In: Muntaner, J., Mayol, J. (Eds.), Biología y conservación de las rapaces mediterráneas, 1994. Monografías nº 4. SEO, Madrid, pp. 189-201.

Donázar, J.A., Palacios, C.J., Gangoso, L., Ceballos, O., González, M.J., Hiraldo, F., 2002. Conservation status and limiting factors in the endangered population of egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) in the Canary Islands. *Biological Conservation* 107, 89-97.

Edens, F.W., Garlich, J.D., 1983. Lead-induced egg production decrease in leghorn and japanese quail hens. *Poultry Science* 62, 1757-1763.

Eens, M., Pinxten, R., Verheyen, R.F., Blust, R., Bervoets, L., 1999. Great and blue tits as indicators of heavy metal contamination in terrestrial ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 81-85.

Ehle, A.L., 1993. Lead. In: Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J. (Eds.), *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Academic Press, London, pp. 2665-2673.

Ethier, A.L.M., Braune, B.M, Scheuhammer, A.M., Bond, D.E., 2007. Comparison of lead residues among avian bones. *Environmental Pollution* 145(3), 915-919. doi: 10.1016/j.envpol.2006.05.001

Fair, J.M., Ricklefs, R.E., 2002. Physiological, growth, and immune responses of japanese quail chicks to the multiple stressors of immunological challenge and lead shot. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 77-87.

Fisher, I., Pain, D.J., Thomas, V. A., 2006. Review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. *Biological Conservation* 131, 421-32.

Fleming, R. H., McCormack, H.A., Whitehead, C.C., 2000. Prediction of breaking strength in osteoporotic avian bone using digitized fluoroscopy, a low cost radiographic technique. *Calcified Tissue International* 67, 309-313.

Forsman, D., 1998. *The Raptors of Europe and the Middle East: A Handbook of Field Identification*. T. and A.D. Poyser, Carlon.

Franson, J.C., 1996. Interpretation of tissue lead residues in birds other than waterfowl. In: Beyer, W.N., Heinz, G.H., Redmon-Norwood, A.W. (Eds.), *Environmental contaminants in wildlife: interpreting tissue concentrations*. Boca Raton, CA: SETAC CRC Lewis Publishers, pp. 265-79.

Franson, J.C., Sileo, L., Pattee, O.H., Moore, J.F., 1983. Effects of chronic dietary lead in american kestrels (*Falco sparverius*). *Journal of Wildlife Diseases* 19, 110-113.

Fry, D.M., 2003. Assessment of lead contamination sources exposing California condors. Final Report. California Department of Fish and Game. Habitat Conservation Planning Branch. Sacramento, CA.

Gangoso, L., 2006. Insularidad y Conservación: el caso del alimoche (*Neophron percnopterus*) en Canarias. Doctoral Thesis. University of Seville, Spain.

Gangoso, L., Palacios, C. J., 2002. Endangered egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) entangled in a power line ground-wire stabilizer. *Journal of Raptor Research* 36, 328–329.

Grandjean, P., 1976. Possible effect of lead on egg-shell thickness in kestrels 1874–1974. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 16, 101.

Gruber, H.E., Gonick, H.C., Khalil-Manesh, F., Sanchez, T.V., Motsinger, S., Meyer, M., 1997. Osteopenia induced by long-term, low- and high-level exposure of the adult rat to lead. *Mineral and Electrolyte Metabolism* 23, 65–73.

Hamilton, J. D., O'Flaherty, E. J., 1995. Influence of lead in mineralization during bone growth. *Fundamental and Applied Toxicology* 26, 265–271.

Hedrick, A. V., Temeles, E. T., 1989. The evolution of sexual dimorphism in animals: hypotheses and tests. *Trends in Ecology and Evolution* 4, 136–138.

IUCN. ,2007. Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org.

Kanti, A., Smith, M.A., 1997. Effects of heavy metals on chondrogenic differentiation of embryonic chick limb cells. *In Vitro Toxicology* 10, 329–338.

Kenntner, N., Tataruch, F., Krone, O., 2001. Heavy metals in soft tissue of white-tailed eagles found dead or moribund in Germany and Austria from 1993 to 2000. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1831–1837.

Knopper, L., Mineau, P., Scheuhammer, A., Bond, D., McKinnon, D., 2006. Carcasses of shot Richardson's ground squirrels may pose lead hazards to scavenging hawks. *Journal of Wildlife Management* 70, 295–299. doi: 10.2193/0022-541X(2006)70[295:COSEGS]2.0.CO;2

Latorre, F.G., Hernández-Ávila, M., Tamayo Orozco, J., Albores Medina, C.A., Aro, A., Palazuelos E., Hu, H., 2003. Relationship of blood and bone lead to menopause and bone mineral density among middle-age women in Mexico City. *Environmental Health Perspectives* 111, 631–636.

Lee, Y. F., Severinghaus, L.L., 2004. Sexual and seasonal differences in the diet of lanyu scops owls based on fecal analysis. *Journal of Wildlife Management* 68, 299–306. doi: 10.2193/0022-541X(2004)068[0299:SASDIT]2.0.CO;2

Mateo, R., 1998. La Intoxicación por ingestión de perdigones de plomo en aves silvestres: aspectos epidemiológicos y propuestas para su prevención en España, Doctoral Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona.

Mateo, R., Estrada, J., Paquet, J.Y., Riera, X., Dominguez, L., Guitart, R., Martinez-Vilalta, A., 1999. Lead shot ingestion by marsh harriers *Circus aeruginosus* from the Ebro delta, Spain. *Environmental Pollution* 104, 435–440.

Mateo, R., Martínez-Vilalta, A., Guitart, R., 1997. Lead shot pellets in the Ebro delta, Spain: densities in sediments and prevalence of exposure in waterfowl. *Environmental Pollution* 96, 335–341.

Mateo, R., Taggart, M., Meharg, A.A., 2003. Lead and arsenic in bones of birds of prey from Spain. *Environmental Pollution* 126, 107–114. doi:10.1016/S0269-7491(03)00055-1

Meretsky, V.J., Snyder, N.F.R., Beissinger, S.R., Clendenen, D.A., Wiley, J.W., 2000. Demography of the California condor: Implications for Reestablishment. *Conservation Biology*, 14, 957–967. doi:10.1046/j.1523-1739.2000.99113.x

Miller, L.M., Vairavamurthy, V. Chance, M.R., Mendelsohn, R., Paschalis, E.P., Betts, F., Boskey, A.L., 2001. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO_4^{3-} vibration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1527, 11–19. doi: 10.1016/S0304-4165(01)00093-9

Ou-Yang, H., Paschalis, E.P., Mayo, W.E., Boskey, A.L., Mendelsohn, R., 2001. Infrared microscopic imaging of bone: spatial distribution of CO_3^{2-} . *Journal of Bone Mineral Research* 16, 893–900. doi: 10.1359/jbmr.2001.16.5.893

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. *Science of the Total Environment* 376, 116–127. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.01.062

Pain, D.J., Meharg, A.A., Ferrer, M., Taggart, M., Penteriani, V., 2005. Lead concentrations in bones and feathers of the globally threatened Spanish imperial eagle. *Biological Conservation* 121, 603–619.

Pattee, O.H. ,1984. Eggshell thickness and reproduction in American kestrels exposed to chronic dietary lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13, 29–34.

Pattee, O.H., Bloom, P.H., Scott, J.M., Smith, M.R., 1990. Lead hazards within the range of the California condor. *The Condor* 92, 931–937.

Pattee, O.H., Hennes, S.K., 1983. Bald eagles and waterfowl: the lead shot connection. 48th North American Wildlife Conference 1983, Wildlife Management Institute, Washington, pp. 230–237.

Perea, J.L., Morales, M., Velasco, J., 1990. El alimoche (*Neophron percnopterus*) en España. Población, distribución, problemática y conservación. Colección Temática. ICONA. Madrid, Spain.

Pounds, J.G., Long, G.J., Rosen, J.F., 1991. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environmental Health Perspectives* 91, 17–32.

Puzas, J. E., 2000. Osteotoxicology: the role of lead in bone diseases. *Current Opinion in Orthopedics* 11, 360–365.

Puzas, J.E., Sickel, M.J., Felter, M.E., 1992. Osteoblasts and chondrocytes are important target cells for the toxic effects of lead. *Neurotoxicology* 13, 783–788.

Ramo, C., Sánchez, C., Hernández, S.A., 1992. Lead poisoning of greater flamingos *Phoenicopterus ruber*. *Wildfowl* 43, 220–222.

Redig, P.T., Lawler, E.M., Schwartz, S., Dunnette, J.L., Stephenson B., Duke, G.E., 1991. Effects of chronic exposure to sublethal concentrations of lead acetate on heme synthesis and immune function in red tailed hawks. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21, 72–77.

Redig, P.T., Stowe, C.M., Barnes, D.M., Arent, T.D., 1980. Lead toxicosis in raptors. *Journal of American Veterinary Medical Association* 177, 941–943.

Rey, C., Renugopalakrishnan, V., Collins, B., Glimcher, M.J., 1991. Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging. *Calcified Tissue International* 49, 251–258. doi: 10.1007/BF02556214

Rocke, T.E., Samuel, M.D., 1991. Effects of lead shot ingestion on selected cells of the mallard immune system. *Journal of Wildlife Diseases* 27, 1–9.

Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., Alvarez-Lloret, P., Gaines, K.F., 2006. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on clapper rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. *Environmental Science and Technology* 40 (16), 4936-4942.

Ronis, M. J.J., Aronson, J., Gao, G.G., Hogue, W., Skinner, R.A., Badger, T.M., Lumpkin, C.K., 2001. Skeletal effects of developmental lead exposure in rats *Toxicological Sciences* 62, 321–329.

Schepelmann, K., 1990. Erythropoietic bone marrow in the pigeon: Development of its distribution and volume during growth and pneumatization of bones. *Journal of Morphology* 203, 21–34. doi: 10.1002/jmor.1052030104

Scheuhammer, A.M., 1987. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury and lead in birds: a review. *Environmental Pollution* 46, 263–295.

Smith, R., Rehman, I., 1995. Fourier transform Raman spectroscopic studies of human bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5, 775–778. doi: 10.1007/BF00120375

Smits, J., Bortolotti, G., Baos, R., Blas, J., Hiraldo, F., Xie, Q., 2005. Skeletal pathology in white storks (*Ciconia ciconia*) associated with heavy metal contamination in southwestern Spain. *Toxicologic Pathology* 33, 441–448. doi: 10.1080/01926230590953097

Smits, J., Bortolotti, G., Baos, R., Jovani, R., Tella, J.L., Hoffmann, W., 2007. Disrupted bone metabolism in contaminant-exposed white storks (*Ciconia ciconia*) in southwestern Spain. *Environmental Pollution* 145, 538–544. doi: 10.1016/j.envpol.2006.04.032

Snoeijs, T., Dauwe, T., Pinxten, R., Vandesande, F., Eens, M., 2004. Heavy metal exposure affects the humoral immune response in a free-living small songbird, the great tit (*Parus major*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46, 399–404. doi: 10.1007/s00244-003-21956.

Taylor, T. G., 1970. The role of the skeleton in eggshell formation. *Annl. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 10, 83–91.

Tejedor, M.C., González, M., 1992. Comparison between lead levels in blood and bone tissue of rock doves (*Columba livia*) treated with lead acetate or exposed to the environment of Alcala de Henares. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 835-842.

Whitehead, C. C., Fleming, R.H., 2000. Osteoporosis in cage layers. *Poultry Sciences* 79, 1033-1041.

**SHORT-TERM EXPOSURE TO DIOXIN IMPAIRS
BONE TISSUE IN MALE RATS**

P. Monica LIND¹, Carolina WEJHEDEN¹, Rebecca LUNDBERG¹, Pedro ALVAREZ-LLORET², Sanne A.B. HERMSEN¹, Alejandro B. RODRIGUEZ-NAVARRO², Sune LARSSON³, Fedor MONCEK⁴ and Agneta RANNUG⁴

¹ *Institute of Environmental Medicine, Department of Biochemical Toxicology, Karolinska Institutet, Box 210, S-171 77 Stockholm, Sweden*

² *Departamento de Mineralogía y Petrología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain*

³ *Department of Surgical Sciences, Orthopaedics, Uppsala University, Sweden*

⁴ *Institute of Environmental Medicine, Division of Work Environment Toxicology, Karolinska Institutet, Box 210, S-171 77 Stockholm, Sweden*

SUBMITTED TO CHEMOSPHERE

ABSTRACT

Chronic and sub-chronic studies in rats have previously shown that dioxin-like compounds impair the bone tissue homeostasis. In the present study, tibiae and serum were analyzed to study possible effects of short term dioxin exposure on rats. Two month old (ca 200 g) male rats were injected with 50 µg 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) kg⁻¹ bw and tibiae were excised five days following the exposure. Bone composition, dimensions and strength were analysed by pQCT and three-point bending test on tibiae. In addition, bone composition was analyzed by optical emission spectroscopy (ICP-OES) and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). Analysis of the serum bone biomarkers procollagen type-I N-terminal propeptide (PINP) and carboxyterminal cross linking teleopeptide (CTX) were also performed. pQCT-results showed alterations in the metaphysis, with a significant decrease in trabecular bone cross-sectional area (-19 %, $p < 0.05$) and a significant increase in total bone mineral density (+7 %, $p < 0.05$) in TCDD exposed rats. Analyses of the bones by ICP-OES and FTIR showed that bones from exposed rats had a higher relative proportion of crystalline phosphate (+13% for ν_1 1080 and +11 % for ν_1 1113, $p < 0.05$) and lower acid phosphate content (-22% for ν_1 1145, $p < 0.05$), resembling the composition of more mature bones. Serum analysis showed that the bone formation marker PINP was decreased (-37 %, $p < 0.05$) and that the bone resorption marker CTX was increased (+14 %, $p < 0.05$) indicating a net loss of bone tissue. In conclusion, five days of exposure to TCDD was sufficient to negatively affect bone tissue in male rats.

Key words: rodents; TCDD; PINP; CTX; mineralization, bone toxicity

INTRODUCTION

Dioxins are widespread pollutants which are found virtually everywhere in our environment in animals as well as in plants. Dioxins have never been commercially produced, but they are formed during waste incineration and as a contaminant during the production of some herbicides. These compounds are lipophilic and bioaccumulate and biomagnify in the food chain. In most studies, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is used as the prototype compound when studying effects of dioxins. Studies on humans and on rodents show that dioxins cause a wide range of toxic effects, including impaired reproduction and cancer (WHO-ECEH/IPCS, 2000). A few subchronic experimental studies show that dioxins and dioxin-like compounds also cause developmental bone and dental effects at low maternal doses (Miettinen et al., 2005; Alaluusua and Lukinmaa, 2006) as well as adverse effects on bone tissue composition and dimensions at higher doses (Lind et al., 1999; Jämsä et al., 2001; Lind et al., 2004). Bone remodeling is regulated by a number of hormones and growth factors to maintain the balance between resorption and formation. Thus, dioxins may interfere with the regulation of bone tissue due to its endocrine disrupting properties.

The mechanisms behind TCDD-induced bone toxicity have been investigated in a few *in vitro* studies. These studies indicate that primarily the osteoblasts are affected. Studies on primary rat osteoblasts exposed to TCDD showed that TCDD interferes with differentiation but not with the proliferation of these cells (Gierthy et al., 1994). A recent *in vitro* study showed that TCDD down-regulates the expression of osteopontin (OPN) in an osteoblast-like rat cell line, UMR-106 (Wejheden et al., 2006). OPN is a protein that promotes attachment of the bone cells to the bone matrix, hence, a down-regulation of OPN could disturb bone formation and bone remodeling (Denhardt and Noda, 1998). Furthermore, resveratrol, an AhR

antagonist, was reported to inhibit the TCDD-mediated effects on osteoblasts, supporting the notion that AhR is involved in TCDD-mediated bone toxicity (Singh et al., 2000). In contrast to the osteoblasts, AhR-expressing osteoclasts seem to be unaffected by short-term exposure to TCDD, since the bone resorbing capacity of the osteoclasts was unchanged (Ilvesaro et al., 2005). Currently, very few studies have focused on the bone toxic effects of dioxin like compounds and until today no studies have been performed to investigate bone effects following short-term exposure to a single dose of TCDD. The present study on bone tissue is part of a larger research project aiming at elucidating the relationship between high dose short-term exposure to dioxin and the wasting syndrome. Therefore, the aim of this study was to investigate if five days of exposure to one single dose of TCDD can affect bone tissue in male rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals and treatment

Male Sprague-Dawley rats were housed in the animal facility at Karolinska Institutet and all procedures were approved by the local ethical committee. The rats were kept individually under standard conditions (50% humidity, 22°C, 12/12h light/dark cycle) in ventilated, filter-top cages containing sterile sawdust bedding and environmental enrichment (plastic piping and cardboard boxes). The animals were fed standard food pellets (R70, Lactamin, Sweden). Weight matched, two months old male Sprague-Dawley rats (ca 200g) were treated with TCDD by a single intraperitoneal injection (*i.p.*) of 50 µg TCDD kg⁻¹ bw in corn oil (*n*=10) or vehicle only (*n*=9). Five days following the exposure, left and right tibiae were excised, blood was collected and serum prepared.

Peripheral quantitative computed tomography - pQCT

The bone composition and dimensions of the tibiae were evaluated by peripheral quantitative computed tomography (pQCT; StratecXCT Research SA+ with software version 5.50R; NorlandStratec Medizintechnik GmbH, Birkenfeld, Germany). Precision, long-term stability, linearity, and accuracy of the pQCT-scanner were evaluated every third day using a validation-phantom. Before analysis, the bones were placed in containers filled with Ringer solution (1l contains 0.3 g Tris; 0.24 g CaCl₂(H₂O); 0.4 g KCl; and 2.05 ml 1 M HCl; pH 7.4).

Cortical variables were determined by mid-diaphyseal scans located at 50% of the total bone length from the proximal tip. The threshold value was set to 710 mg cm⁻³, values above were defined as cortical bone. Trabecular variables were determined by metaphyseal scans at a point located at 14% of the total bone length from the proximal tip. Values ranging from 280 to 400 mg cm⁻³ were considered to be trabecular bone. The voxelsize was set to 0.07 mm.

Reproducibility: To evaluate the reproducibility of the pQCT measurements, the coefficients of variation (CV) for the different variables were calculated from 10 repeated measurements with a single sample being repositioned before each measurement. The CV for the ten different pQCT-measurements at the metaphyseal measurement point were as follows: Total Bone Mineral Content (total BMC) 2.0%, Total Bone Mineral Density (total BMD) 2.0%, Total Cross Sectional Area (total CSA) 1.6%, Trabecular Bone Mineral Content (trabecular BMC) 4.6%, Trabecular Bone Mineral Density (trabecular BMD) 4.2%, Trabecular Cross Sectional Area (trabecular CSA) 2.1% and Periosteal circumference (PERIC) 0.8%.

The CV for the ten different pQCT-measurements at the diaphyseal measurement point were as follows: Total CSA 0.6%, Total BMC 0.7%, Cortical CSA 0.7%, Cortical BMC 0.6%, Cortical BMD 0.6%, Cortical Thickness (Cortical THCK) 0.8%, PERIC 0.3%, and Endosteal circumference (ENDOC) 0.6%.

Biomechanical testing

Three-point bending test was performed on left tibiae using an electromechanical material testing machine (Avalon technology Inc., Rochester, MN, USA) with a span length of 15 mm and a loading speed of 0.48 mm s⁻¹. Bone strength was measured at 50% of the total length of the bone. Thus, the load was applied at the mid-diaphysis in an anteroposterior direction at the same point as where the pQCT measurement for cortical bone was performed. The load and displacement were sampled with a frequency of 50Hz and stored digitally. Displacement at failure (the total amount of movement of the load in mm from the moment of contact with the bone surface until the bone fractured) and the load applied at the moment when the bone fractured were recorded in Newton (N). The data accumulated during each test were used to construct a load-displacement curve. The area under the curve defines the amount of energy absorbed until failure (breakage) measured in N mm. The maximum slope of the load-displacement curve is defined as the bone's stiffness to failure (N mm⁻¹). The same equipment and methodology was used in several studies (Lind et al., 2001; Lundberg et al., 2007) with slight adjustments to accommodate the specific bones being tested.

Bone chemical composition

Bone chemical composition was analyzed by optical emission spectroscopy (ICP-OES) and Fourier transform infrared spectrometry

(FTIR). The right tibiae were cleaned with a scalpel, rinsed with Milli-Q water and powdered using a cryogenic mill (CertiPrep 6750 Freezer/Mill, SPEX). For the ICP-OES analyses, 50 mg of bone powder was digested in a 10 ml solution of 10% HNO₃ and 3% H₂O₂. Calcium (Ca) and phosphorus (P) concentrations were measured using an ICP-OES (Mod. ARL 3410, Fisons). For quality control purposes, standard trace grade solutions containing Ca and P in sample range concentrations were prepared and analyzed after every five samples. All standard solutions were within 5% of the reported values. For the FTIR analyses, 5 mg of bone powder was mixed with 90 mg of FTIR-grade KBr and pressed under vacuum. Infrared spectral data were collected on a Fourier transform infrared spectrometer (Magna IR200, Nicolet) at 2 cm⁻¹ resolution over 128 scans. The amounts of phosphate, carbonate, and organic matrix in bone were determined from the peak area of absorption bands associated with phosphate, carbonate, and amide groups in the infrared spectra. Overlapping peaks under the above mentioned bands were resolved and their integrated areas measured using a curve fitting software (Peakfit) and applying a second derivative methodology. The procedure is described in detail elsewhere (Rodriguez-Navarro et al., 2006). This methodology allows for a detailed and quantitative analysis of different molecular constituents of bone mineral. In particular, different compositional variables were determined to quantify the potential effects of toxicants on bone mineralization. To describe bone degree of mineralization and carbonate content in the mineral from FTIR analyses:

Degree of mineralization of bone (mineral) was defined as the ratio between the peak area of phosphate and amide I bands:

$$(1) \text{ mineral} = A_{1200_900} / A_{1660}$$

Carbonate in bone mineral (minCO_3) was defined as the ratio between the peak area for 1405 cm^{-1} (carbonate type B substitution) to phosphate band area:

$$(2) \text{minCO}_3 = A_{1405} / A_{900_1200}$$

Serum analysis of bone biomarkers

The N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) was determined in the serum as a marker for bone formation. PINP is an accepted and reliable marker of early effects on the bone formation (Hale et al., 2007). The Rat/Mouse PINP enzyme immunoassay (EIA; Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, DK) was used according to the manufacturer's instructions. In short, 5 μl of serum was incubated with biotin labeled PINP in an antibody coated microtitre plate for 1 hour. Thereafter, the plate was incubated with the enzyme conjugate for 30 minutes. Subsequently, the enzyme substrate was added and after 30 minutes the absorbance was measured at 450 nm with 595 nm as a reference (VmaxTM Kinetic Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, California, USA). Data reduction was done by preparing a standard curve with a 4-parametric logistic curve fit using the standards, which were included in the test kit. All samples were analyzed in duplicate.

Carboxyterminal telopeptide of type I collagen (CTX) is a widely accepted bone resorption marker and to measure the level of CTX, a RatLapsTM Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA; Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, DK) was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 10 μl of serum was incubated with the primary antibody at 4 °C over night. After washing, the samples were incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody for one hour. Following incubation with the substrate solution, the absorbance was measured at 450 nm. In the same test set, a standard curve was

included together with a negative control. A standard curve was prepared with the absorbances from the six standards against the corresponding RatLaps concentration. Data reduction was performed using a 4-parametric logistic curve fit.

Statistics

Statistical analysis was performed using StatView 5.0; SAS Institute INC., Cary, NC, USA. The results obtained were adjusted for body weight by ANCOVA (analysis of covariance). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Body Weight

The body weight did not differ between TCDD treated animals (226.9 ± 6.0 g) and control animals (238.3 ± 5.9 g).

Peripheral quantitative computed tomography - pQCT

The results from the pQCT analyses are shown in Table 1A and 1B. A significant decrease in trabecular cross sectional area (Trabecular CSA) and an increase in the total bone mineral density (Total BMD) in the metaphysis in rats exposed to TCDD (-18% and + 6.9% respectively; $p < 0.05$; Table 1A) versus non-exposed rats were observed. No variables were significantly altered in the diaphysis of TCDD exposed rats (Table 1B).

Table 1A. pQCT Metaphysis. Results obtained from pQCT (peripheral quantitative computed tomography) analysis at a measure point located at a distance of 14% of the total bone length from the proximal tip of tibiae from two months old, male Sprague/Dawley rats, *i.p.* injected with 50 µg 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) kg⁻¹ bw in corn oil or corn oil only (controls). Values are given as mean ± SEM; *n* = number of individuals. * significantly (*p*<0.05) different from the corresponding control value (ANCOVA). BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density; CSA = cross sectional area; PERIC = periosteal circumference.

pQCT Metaphysis, 14%	Control Mean ± SEM (<i>n</i> =9)			TCDD Mean ± SEM (<i>n</i> =10)		
Length of bone (mm)	35.2	±	0.2	35.3	±	0.2
Total CSA (mm ²)	20.2	±	0.8	19.0	±	0.9
Total BMC (mg mm ⁻¹)	7.7	±	0.2	7.7	±	0.5
Total BMD (mg cm ⁻³)	380.6	±	5.8	404.9	±	7.4*
Trabecular CSA (mm ²)	11.5	±	0.5	9.4	±	0.2*
Trabecular BMC (mg mm ⁻¹)	2.6	±	0.1	2.3	±	0.1
Trabecular BMD (mg cm ⁻³)	223	±	3.2	243	±	10.6
PERIC (mm)	108.9	±	1.2	103.0	±	1.8

Table 1B. pQCT Diaphysis. Results obtained from the pQCT (peripheral quantitative computed tomography) analysis at a measure point located at a distance of 50 % of the total bone length from the proximal tip of tibiae from two months old, male Sprague-Dawley rats, *i.p.* injected with 50 μg 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) kg^{-1} bw in corn oil or corn oil only (controls). Values are given as mean \pm SEM; *n* = number of individuals. BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density; CSA = cross sectional area; PERIC = periosteal circumference, ENDOC = endosteal circumference; THCK = thickness.

pQCT Diaphysis, 50%	Control	TCDD
	Mean \pm SEM (<i>n</i> =9)	Mean \pm SEM (<i>n</i> =10)
Length of bone (mm)	35.2 \pm 0.2	35.3 \pm 0.2
Total CSA (mm ²)	5.4 \pm 0.2	5.2 \pm 0.1
Total BMC (mg mm ⁻¹)	4.3 \pm 0.1	4.1 \pm 0.1
Total BMD (mg cm ⁻³)	788.5 \pm 10.3	785.4 \pm 11.3
Cortical CSA (mm ²)	3.0 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1
Cortical BMC (mg mm ⁻¹)	3.7 \pm 0.1	3.5 \pm 0.1
Cortical BMD (mg cm ⁻³)	1227.2 \pm 5.6	1229.7 \pm 5.2
Cortical THCK (mm)	0.434 \pm 0.004	0.426 \pm 0.008
PERIC (mm)	8.2 \pm 0.1	8.1 \pm 0.1
ENDOC (mm)	5.5 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1

Biomechanical testing

No variables were significantly altered in three-point bending test of the diaphysis of the TCDD exposed rats (Table 2).

Table 2. Biomechanical properties. Results from the three-point bending test. The bones were broken at the diaphyseal measure point located at a distance of 50% of the total bone length from the proximal tip of tibiae from male Sprague-Dawley rats, *i.p.* injected with 50 µg 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) kg⁻¹ bw. Controls were treated with corn oil. Values are given as mean ± SEM. *n* = number of individuals.

Three-point bending test	Control	TCDD
	Mean ± SEM (<i>n</i> =8)	Mean ± SEM (<i>n</i> =10)
Load at failure (N)	54.0 ± 1.8	51.4 ± 1.7
Energy absorption at failure (N mm)	30.8 ± 2.4	28.8 ± 2.1
Displacement at failure (mm)	0.84 ± 0.04	0.81 ± 0.03
Stiffness to failure (N mm ⁻¹)	67.0 ± 4.4	64.2 ± 2.4

Bone chemical composition

Values of bone compositional variables determined by ICP-OES and FTIR spectrometries for the TCDD exposed and control groups are summarized in Table 3. A1660, A1405 and A900_1200 are associated with amide, carbonate, and phosphate groups of bone, respectively. The “a” labelled peaks are associated with different molecular environments of phosphate groups. Specifically, a956 and a1145 are associated with acid phosphate groups while the other six peaks are associated with crystalline phosphate (Boskey et al., 1998). The total amide, total phosphate and carbonate contents as well as the degree of mineralisation did not significantly differ between the two groups. Nevertheless, the relative amounts of phosphate subcomponents did significantly differ between exposed and non-exposed rats. The values of a1080 and a1113, both associated to crystalline phosphate, were significantly greater in bones from exposed rats versus non-exposed (+13% for a1080 and +11% for a1113, $p < 0.05$) and values of a1145, associated to acid phosphate, were significantly smaller in bones from exposed versus non-exposed rats (-22% for a1145, $p < 0.05$).

Table 3. Results from the analysis of the bone composition by optical emission spectroscopy (ICP-OES) and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). Summary of bone compositional variables in tibiae from male Sprague-Dawley rats, *i.p.* injected with 50µg 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) kg⁻¹ bw in corn oil, or with corn oil only (controls). Values are given as mean ± SEM. *n* = number of individuals. * significantly (p<0.05) different from the corresponding control value (ANCOVA). Variables are described in the Materials and Methods section.

ICP-OES and FTIR	Control		TCDD	
	Mean ± SEM (<i>n</i> =9)		Mean ± SEM (<i>n</i> =9)	
Ca/P	1.622	± 0.006	1.634	± 0.010
A1660	122.5	± 2.4	126.8	± 2.2
A900_1200	135.0	± 4.3	142.4	± 1.5
mineral	1.105	± 0.041	1.126	± 0.024
minCO3	0.050	± 0.003	0.051	± 0.001
a956	0.090	± 0.005	0.095	± 0.003
a994	0.141	± 0.002	0.134	± 0.005
a1020	0.203	± 0.006	0.210	± 0.008
a1046	0.158	± 0.003	0.158	± 0.004
a1080	0.145	± 0.009	0.167	± 0.009*
a1113	0.141	± 0.007	0.157	± 0.006*
a1145	0.117	± 0.020	0.082	± 0.018*

Serum analysis of bone biomarker

The levels of the bone formation marker PINP and the bone resorption marker CTX were 37.3% lower (p<0.05) and 14.4% higher (p<0.05),

respectively in serum from TCDD-exposed rats than in controls (Figure 1A and Figure 1B).

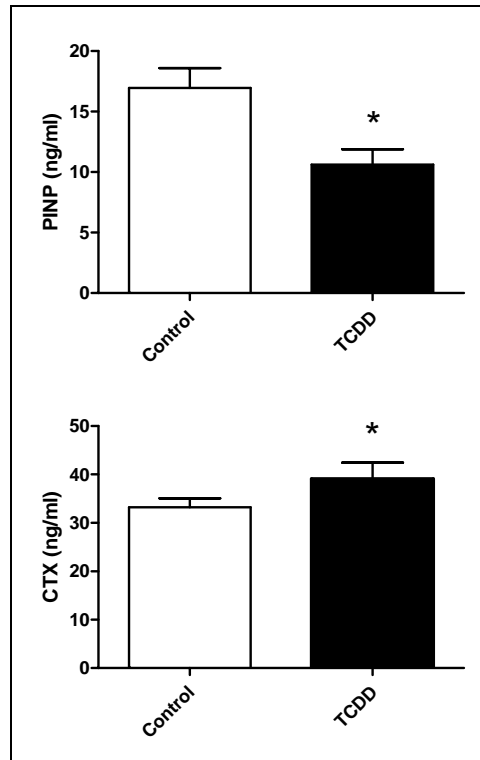


Figure 1. Bone biomarkers in serum.

Figure 1A. The serum level of procollagen type-I N-terminal propeptide (PINP) was significantly lower in male Sprague-Dawley rats, *i.p.* injected with 50 μg 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) kg^{-1} bw. Values are presented as mean \pm SEM. * significantly ($p < 0.05$) different from the corresponding control value (ANCOVA).

Figure 1B. The serum level of carboxyterminal telopeptide of type I collagen (CTX) was significantly higher in male Sprague-Dawley rats, *i.p.* injected with 50 μg 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) kg^{-1} bw. Values are presented as mean \pm SEM. * significantly ($p < 0.05$) different from the corresponding control value (ANCOVA).

DISCUSSION

Recent experimental studies have established that bone tissue is a sensitive target for exposure to dioxin and dioxin-like compounds (Lind et al., 1999; Lind et al., 2004; Miettinen et al., 2005). However, this is the first study where a short-term exposure to one single high dose of TCDD was studied with regard to the possible impact on bone tissue.

The pQCT results from the present study show that the trabecular bone in the metaphysis of male Sprague-Dawley rats was affected by exposure to TCDD (Table 1A). In the cortical bone, however, at the diaphysis no changes neither as analyzed with pQCT analysis nor with three-point bending test, were detected (Table 1B and Table 2). The remodeling rate of cortical bone tissue is very slow and much slower than that of trabecular bone tissue (Parfitt, 2002) and the above described changes indicate a more rapid response to TCDD in the trabecular bone tissue. N.B. that this effect was seen independently of body weight as all the variables were adjusted for body weight. In other studies, where a change in cortical variables has been observed, animals were exposed to dioxins or dioxin-like compounds for longer time or during the fetal and postnatal development (Lind et al., 1999; Lind et al., 2004; Miettinen et al., 2005). Thus, a change in cortical bone tissue after only five days exposure to TCDD was not expected.

The bone formation biomarker PINP was decreased in the serum of the TCDD exposed male rats (Figure 1A). PINP has previously been shown to be an early serum biomarker for assessing bone formation in rats (Hale et al., 2007). Thus, the observed decrease in PINP level after only five days exposure to TCDD in this study might reflect decreased bone formation (via the bone forming osteoblasts) in response to TCDD. The serum level of CTX was increased in TCDD-exposed rats indicating a more

aggravated activity of the osteoclasts (Fig 1B). The level of CTX has been reported to be increased in menopausal women (Rosenbrock et al., 2002) and a study with human osteoclasts showed that estrogen inhibited the release of CTX from immature osteoclasts, but had no effect on mature human osteoclasts (Sorensen et al., 2006). Estrogen is suggested to attenuate bone resorption by inhibiting the osteoclastogenesis and the activity of the osteoclasts (Blair and Zaidi, 2006). In this study, the level of CTX was increased, indicating that in our experiment TCDD might have had an anti-estrogenic effect on the CTX release, causing increased bone resorption. The increased CTX level was at the same time accompanied by a decreased level of PINP. Therefore, we suggest that short-term exposure to TCDD has an impact, both on the osteoclasts and the osteoblasts and that exposure to one single dose of TCDD might decrease bone formation and also increase bone resorption in male Sprague-Dawley rats. However, an *in vitro* study by Ilvesaro *et. al* showed that short-term exposure to TCDD did not affect the activity of the osteoclasts (Ilvesaro et al., 2005). It is possible that, because of the obvious effects of the levels of the osteoblastic marker PINP, the effects we observed are mainly mediated by the osteoblasts. It is, however, important to keep in mind that *in vitro* data do not fully reflect the *in vivo* situation as the local and systemic influences on the specific bone cell types are not accounted for in *in vitro* studies using one cell type in isolation.

Treatment with TCDD did not affect the degree of mineralization (analysed with ICP-OES and FTIR spectrometries) but it significantly altered the chemical composition of bone at the molecular level. Specifically, the bone mineral in treated rats showed a lower relative amount of acid phosphate (HPO_4 , estimated from *a1145*) and a higher relative amount of crystalline phosphate components (e.g., *a1080* and *a1113*) compared to controls. During bone maturation there is a

progressive loss of acid phosphate content which is converted into crystalline phosphate. Thus, the observed changes in the relative amount of phosphate groups in different molecular environments are consistent and indicate that TCDD-treatment results in the formation of bone mineral with a composition characteristic of more mature bone. These compositional changes could result from a reduced metabolic activity of bone induced by exposure to toxicants (Rodriguez-Navarro et al., 2006). This is in agreement with the both the observed reduction in area of the most metabolically active bone (e.g., trabecular bone) and the decreased levels of the bone formation biomarker PINP.

In summary, five days of exposure to TCDD was sufficient to negatively affect bone tissue in male Sprague-Dawley rats. We did detect effects in the bone tissue of the tibia as well as of bone markers in serum. A reduced trabecular bone area and an impaired chemical composition were observed in the tibiae. Furthermore, a pronounced decrease in the serum level of the bone formation marker PINP and an increase in the serum level of bone resorption marker CTX were observed. These results point to a very rapid influence of TCDD on the bone remodeling processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by The Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Spatial Planning (FORMAS, grants 216-2006-1306, 210/2003-1161). We would like to thank Associate Professor Jan Örberg and Associate Professor Annika Hanberg for valuable comments on the manuscript.

REFERENCES

Alaluusua, S., Lukinmaa, P.L., 2006. Developmental dental toxicity of dioxin and related compounds--a review. *Int Dent J* 56, 323-331.

Blair, H.C., Zaidi, M., 2006. Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathways. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 23-32.

Boskey, A.L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S.B., Ducy, P., Karsenty, G., 1998. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 23, 187-196.

Denhardt, D.T., Noda, M., 1998. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 30-31, 92-102.

Gierthy, J.F., Silkworth, J.B., Tassinari, M., Stein, G.S., Lian, J.B., 1994. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibits differentiation of normal diploid rat osteoblasts in vitro. *J Cell Biochem* 54, 231-238.

Hale, L.V., Galvin, R.J., Risteli, J., Ma, Y.L., Harvey, A.K., Yang, X., Cain, R.L., Zeng, Q., Frolik, C.A., Sato, M., Schmidt, A.L., Geiser, A.G., 2007. PINP: a serum biomarker of bone formation in the rat. *Bone* 40, 1103-1109.

Ilvesaro, J., Pohjanvirta, R., Tuomisto, J., Viluksela, M., Tuukkanen, J., 2005. Bone resorption by aryl hydrocarbon receptor-expressing osteoclasts is not disturbed by TCDD in short-term cultures. *Life Sci* 77, 1351-1366.

Jämsä, T., Viluksela, M., Tuomisto, J.T., Tuomisto, J., Tuukkanen, J., 2001. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on bone in two rat strains

with different aryl hydrocarbon receptor structures. *J Bone Miner Res* 16, 1812-1820.

Lind, P.M., Eriksen, E.F., Lind, L., Orberg, 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.

Lind, P.M., Eriksen, E.F., Sahlin, L., Edlund, M., Orberg, 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 Pharmacol* 154, 236-244.

Lind, P.M., Lind, L., Larsson, S., Orberg, J., 2001. Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. *Bone* 29, 265-270.

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 Environ Health A* 70, 614-619.

Miettinen, H.M., Pulkkinen, P., Jamsa, T., Koistinen, J., Simanainen, U., Tuomisto, J., Tuukkanen, J., Viluksela, M., 2005. Effects of in utero and lactational TCDD exposure on bone development in differentially sensitive rat lines. *Toxicol Sci* 85, 1003-1012.

Parfitt, A.M., 2002. Misconceptions (2): turnover is always higher in cancellous than in cortical bone. *Bone* 30, 807-809.

Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., Alvarez-Lloret, P., Gaines, K.F., 2006. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on Clapper Rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. *Environ Sci Technol* 40, 4936-4942.

Rosenbrock, H., Seifert-Klauss, V., Kaspar, S., Busch, R., Lippa, P.B., 2002. Changes of biochemical bone markers during the menopausal transition. *Clin Chem Lab Med* 40, 143-151.

Singh, S.U., Casper, R.F., Fritz, P.C., Sukhu, B., Ganss, B., Girard, B., Jr., Savouret, J.F., Tenenbaum, H.C., 2000. Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J Endocrinol* 167, 183-195.

Sorensen, M.G., Henriksen, K., Dziegiel, M.H., Tanko, L.B., Karsdal, M.A., 2006. Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts. *DNA Cell Biol* 25, 475-483.

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 Commun* 341, 116-120.

WHO-ECEH/IPCS, 2000. Assessment of the health risk of dioxins:reevaluation of the tolerable daily intake (TDI). *Food Addit. Contam.* 17, 223-369.

Manuscript IV

EFFECTS OF 3,3',4,4', 5 - PENTACHLOROBIPHENYL (PCB126) ON VERTEBRAL BONE MINERALIZATION AND ON THYROXIN AND VITAMIN D LEVELS IN SPRAGUE-DAWLEY RATS

Pedro ALVAREZ-LLORET¹, P. Monica LIND², Ingrid NYBERG³, Jan ÖRBERG³, Alejandro B. RODRÍGUEZ-NAVARRO¹

¹ *Departamento de Mineralogía y Petrología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain*

² *Institute of Environmental Medicine, Division of Biochemical Toxicology, Karolinska Institutet, Box 210, S-171 77 Stockholm, Sweden*

³ *Uppsala University, Department of Environmental Toxicology, Norbyvägen 18 A, S-752 36 Uppsala, Sweden*

SUBMITTED TO TOXICOLOGY LETTERS

ABSTRACT

The aim of the present study is to use Fourier transform infrared spectrometry (FTIR), and TEM techniques, to make a more detailed description of toxic effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) on bone tissue at the molecular level, and in addition to explore whether the levels of vitamin D and thyroxin are affected in the serum of the rats. For this purpose Sprague-Dawley rats were exposed (n=10) to PCB126 (ip) for 3 months (total dose, 384 µg/kg bodyweight), while control rats (n=10) were injected with corn oil (vehicle). Results from FTIR showed that vertebrae from the exposed rats had an overall lower degree of mineralization (-8.5%; $p < 0.05$) compared with the controls. In addition, results from peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) analyses showed significant increases in the trabecular bone mineral density (+12%; $p < 0.05$) in the exposed group compared with the controls. The TEM analyses also showed an alteration in the crystallinity properties of vertebral bone mineral with a significant decrease in the size and crystallinity of apatite crystal forming the bone tissue in the exposed vs. non-exposed rats. Serum analysis revealed lower levels of thyroid hormones, FT4 (-42%; $p < 0.005$), TT4 (-26%; $p < 0.005$) and (-21%, $p < 0.005$) vitamin D in exposed group compared to control animals. The complementary techniques (TEM and FTIR) used in this study have revealed insights into possible bone mineralization alteration due to PCB126 exposure. The lowering of both the thyroxin and vitamin D serum levels might be an underlying explanation for the observed effects.

Keywords: rodent, PCB126, bone mineral density, TEM, FTIR, vitamin D, thyroxin

INTRODUCTION

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are widespread and persistent environmental contaminants. PCBs were widely used as diluents, flame retardants, fluids for capacitors and transformers (Hansen, 1999). A group of PCB congeners, the so-called dioxin-like PCBs, including 3,3',4,4',5 - pentachlorobiphenyl (PCB126), can assume a planar configuration similar to that of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). The presence and bioaccumulation of PCB in biota and in the environment have been extensively described (Tanabe, 1988; Hoffman et al., 1996; Kannan et al., 1998; Magnusson et al., 2006). Several studies have reported toxic effects due to PCB exposure in animals and *in vitro* experimental systems. In animals, this exposure to PCBs might cause a variety of adverse effects, including hepatic microsomal-enzyme induction, liver enlargement, lipid deposition, necrosis, higher serum levels of liver-associated enzymes, fibrosis or carcinogenicity (USEPA, 1996). Likewise, mounting evidence indicates that exposure to PCBs can alter normal growth by acting as endocrine disruptors (Brouwer, 1991; Cheek et al., 1999). Recent studies have also demonstrated that this disruption in the endocrine system might alter the normal processes of mineral deposition and remodelling in bone tissue (Sonne et al., 2004; Rodriguez-Navarro et al., 2006; Ramajayam et al., 2007).

Bone is a biocomposite consisting basically of apatite crystals deposited in an oriented fashion and integrated within an organic matrix, mostly collagen fibrils (Boskey, 2007). Bone remodelling (i.e. bone resorption and formation) is essential to skeletal-bone renewal and for maintaining normal calcium homeostasis. Bone mineral composition is widely influenced by various nutritional and environmental factors. Inanition, exposure to harmful chemicals and extreme temperature among other sources of environmental stress have been shown to alter normal bone

mineral composition (Rodriguez-Navarro et al., 2006; Lundberg et al., 2007; Brandt and Siegel, 1978; Dietz and Steinberg, 1953). In particular, previous studies in different wildlife and laboratory animal species have demonstrated that exposure to organochlorines may trigger bone mineral disorders (Bergman et al., 1992; Lind et al., 1999; Bengtsson et al., 1985; Olsson et al., 1994; Rodriguez-Navarro et al., 2006). Bone remodelling processes depend on a variety of growth factors and on the corporal hormonal status in order to maintain normal bone homeostasis. Therefore, exposure to persistent organic pollutants (POPs) may impair the bone tissue by disrupting the endocrine system. In our case, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126; IUPAC No. 126) has previously been described as a compound with anti-estrogenic effects (Krishnan and Safe, 1993; Gierthy et al., 1997). However, some studies have demonstrated that PCB exposure reduces serum concentrations of thyroid hormones (Roth-Harer et al., 2001; Brouwer, 1991; Byrne et al., 1987). Thyroid hormones are fundamental in a wide range of biological functions, and is essential for normal bone maturation *in utero* and in early stages of life (Bassett et al., 2007). Consequently, an alteration of thyroid hormone homeostasis due to PCB-induced toxicity may perturb skeletal development and the bone tissue mineralization. Previous studies have shown PCB126 induced effects on bone mineral composition and strength might be related to the estrogen status (Lind et al., 1999; Lind et al., 2000; Lind et al., 2004). Furthermore, PCB126 exposure resulted in functional and structural alteration in bone tissue, i.e. decreased collagen content (Lind et al., 2000). As we have previously shown that PCB126 affects the bone tissue in rats, the present study, as an extension of previously presented data, uses FTIR, and TEM techniques, to provide a more detailed description of the toxic effects of PCB on bone tissue and in addition to explore if the levels of vitamin D and thyroxin were affected in the serum of the rats.

MATERIAL AND METHODS

Animal description and experimental design

The experiments were reviewed and approved by the local ethical committee for animal experimentation. The animal handling details and general experimental design have been described elsewhere (Lind et al., 1999; Lind et al., 2000; Lind et al., 2004). In brief; 10 female Sprague-Dawley rats (Møllegaards breeding centre Ltd. Denmark) were exposed to PCB126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA), 64 µg/kg body weight, i.p. injection on days 14, 22, 36, 48, 56 and 68 for 3 months -total dose 384 µg/kg b.w.-). This dose was intended to give maximal induction of CYP1A but not to cause any overt toxic effects (Chu et al., 1994). The 10 control rats were injected in the same manner with the vehicle (corn oil; Sigma Chemical, St Louis, MO). Rats were sacrificed at 6 months of age by an overdose of Eqvitesin (chloral hydrate 182 mg/kg, pentobarbital 41.7 mg/kg). Sera were stored in -70°C until analysis of 25OH-vitamin D and thyroid hormone levels. The 3rd and 4th lumbar vertebra were dissected and stored in buffer (Ringer solution pH 7.4, -20°C) for further analysis using densitometric (peripheral quantitative computed tomography, pQCT), TEM and FTIR analyses. Two of the 4th lumbar vertebrae, one from each group were omitted from the pQCT-analysis due to handling error during the dissections.

Fourier Transform Infrared (FTIR)

Samples from the 3rd lumbar vertebra were prepared as potassium bromide pellets and were analysed by FTIR. Therefore, 5 mg of vertebral bone powder samples, previously ground in a cryogenic mill (CertiPrep 6750 Freezer/Mill, SPEX), were mixed in an agate mortar with 90 mg of KBr (Perkin Elmer). Pellets pressed under vacuum at 9 metric tonnes of pressure for 10 min were prepared. FTIR spectra were recorded with a

Nicolet Magna IR200 spectrometer. For each sample, 1024 scans were collected at 2 cm⁻¹ resolution. Spectra were acquired in absorbance mode. A second derivative methodology was used to separate overlapped peaks allowing for a more detailed analysis of the different molecular components of bone mineral. A mixed Gaussian-Lorentzian function was used to fit the contours of the IR bands. The integrated peak areas of bands under the ν_1 , ν_3 phosphate region (900-1200 cm⁻¹), amide I region (1450-1950 cm⁻¹) and carbonate (1405 cm⁻¹) were then calculated. A detailed description of the methodology has been described elsewhere (Rodriguez-Navarro et al., 2006).

The following descriptive parameters were calculated to measure bone composition from FTIR spectroscopy data:

The degree of mineralization of bone mineral is defined as the mineral-to-matrix ratio and calculated as:

$$mineral = A1200_900 / A1660 \quad (1)$$

where A1200_900 expresses the area of 900-1200 cm⁻¹ associated to the phosphate band (ν_1 , ν_3 phosphate region) and A1660 the area of 1660 cm⁻¹ associated to amide I band (bone organic matrix).

The relative mineral carbonate content was expressed as:

$$minCO_3 = A1405 / A1200_900 \quad (2)$$

calculated as the ratio of A1405, which corresponds to the peak area at 1405 cm⁻¹ (carbonate-type B substitution), to A1200_900, described above as the area of 900-1200 cm⁻¹ phosphate band (ν_1 , ν_3 phosphate region).

Curve-fitting of the $\nu_1, \nu_3 PO_4^{3-}$ band (900-1200 cm^{-1}) comprise a variety of components corresponding to different apatitic phosphate environments. Crystallinity, which is an index of crystal size/perfection, was calculated as:

$$Crystallinity\ Index = A_{1030}/A_{1020} \quad (3)$$

where A1030 and A1020 correspond to the peak area of subbands at 1030 cm^{-1} (highly crystallinity apatite) and 1020 cm^{-1} (poorly crystallinity apatite) determined by curve-fitting.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Embedded samples from the 3rd lumbar vertebra in resin were cut into thin section (~200 nm thick) and thinned by ion bombardment (CIO MILL Gatan). Afterwards, sections were transferred onto copper grids and sputter coated with carbon before analysis using a Hitachi UHS evaporator. A STEM PHILIPS CM20 transmission electron microscopy operated at 80 KV was employed to study the rat vertebral bone sections. Mineral characteristic were also examined by the analysis of transmission electron diffraction patterns.

Peripheral quantitative computed tomography - pQCT

The 4th lumbar vertebra was mounted in a Stratec XCT 960A densitometer (pQCT; Stratec XCT 960A with software version 5.20; Norland Stratec Medizintechnik GmbH, Birkenfeld, Germany). Precision, linearity and accuracy of the pQCT scanner were evaluated every third day using a validation phantom. A scan was taken at approximately the centre of the vertebra, at 4.5 mm from the endplate, using voxel size 0.148 × 0.148 × 1 mm. In this scan, the area of the vertebral body was manually selected as the region of interest. The slice gave data of trabecular bone mineral density (BMD, $mg\ cm^{-3}$) using contmode 1 and peelmode 2, and a $0.53\ cm^1$

attenuation setting, whereas the attenuation threshold 0.93 cm^{-1} represented cortical mineral density (BMD, mg cm^{-3}).

Reproducibility: For the evaluation of the reproducibility of the pQCT measurements the coefficient of variation (standard deviation/mean) for the different calculated variables was calculated from 10 repeated measurements of the same sample. For the measurement the CVs were: trabecular BMD 10 % and cortical BMD 1 %.

Serum analyses

Vitamin D

25-OH-vit D measurements were performed using a radioimmuno assay (RIA) standard IDS kit (IDS Ltd., Boldon, England).

Thyroxin

Serum total T4 (TT4) and free T4 (FT4) were measured by a radioimmuno assay (RIA) technique using standard Amerlex kits (Johnson and Johnson, Amersham, UK; Hallgren et al., 2001).

Statistical Analyses

The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA). Analysis of covariance (ANCOVA) was used when adjusting for the continuous variable body weight. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Tests were made using Statview for Windows (Version 5.0.1, SAS Inst. Inc., Cary,NC, USA).

RESULTS

Body Weight

The rats exposed to PCB126 showed a marked loss (-6.2 %; $p < 0.05$, Table 1) in body weight compared to the control group.

Bone chemical composition

Calculated vertebral bone mineral compositional parameters determined from FTIR analyses are presented in Table 1. Neither the mineral carbonate content - CO_3min - nor the crystallinity index - CI - differed significantly between the two. Nevertheless, compared to non-exposed rats the degree of mineralization in bone vertebrae was significantly lower (-8.5 %; $p < 0.05$) in rats exposed to PCB126.

Peripheral quantitative computed tomography - pQCT

The results from the pQCT analysis revealed a significant increase in the trabecular density of bone vertebrae in rats exposed to PCB126 (+12 %; $p < 0.05$) vs. control. However, the cortical density calculated from pQCT data did not show any significant difference between the two groups (Table 1).

Table 1. Body weight measurements, FTIR and pQCT analysis. Results for body weight measurements, FTIR (Fourier transform infrared) spectrometry and pQCT (peripheral quantitative computed tomography) analysis of vertebrae from female Sprague-Dawley rats exposed to 3,3',4,4',5 - pentachlorobiphenyl (PCB 126, total dose 384 μ g/kg body weight) or with corn oil (control). Values are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). n is the number of individuals used for each analysis.

	<i>Treatment</i>							
	Control				PCB 126			
	Mean	\pm	SEM	n	Mean	\pm	SEM	n
<i>Body weight (g)</i>	301.1	\pm	4.95	10	282.5	\pm	5.35*	10
<i>FTIR analysis</i>								
mineral	1.314	\pm	0.042	10	1.203	\pm	0.029*	10
CO_3min	0.071	\pm	0.049	10	0.073	\pm	0.028	10
CI	1.305	\pm	0.002	10	1.271	\pm	0.002	10
<i>pQCT analysis</i>								
Trabecular density (mg/cm ³)	495.6	\pm	22.799	10	562.8	\pm	18.085*	9
Cortical density (mg/cm ³)	1002.2	\pm	10.046	10	991.4	\pm	5.572	9

*significantly ($p < 0.05$) different from the correspondence control value.

Crystallinity properties

The bone sections from three individuals in each group (exposed and control group) were examined by transmission electron microscopy (TEM) to study the distribution and crystallinity of apatite crystals on different closely located areas of the bone vertebrae (cortical region from the vertebral body -opposite the spinous process-). Additionally, the electron diffraction patterns were examined.

In the analysis of TEM images of the vertebrae sections of individuals treated with PCB, we detected a smaller density of apatite crystals, with plate-like shapes, across the transversal thickness of the cortical region when compared to control group (Figure 1; a,b). Electron diffraction patterns from the cortical regions (from margin to centre) of the vertebrae sections from both groups are also displayed in Figure 1. In both cases the diffraction patterns were composed of diffuse diffraction rings corresponding to the principal apatite reflections rings, namely 002 and 211. A detailed analysis showed some marked differences in the appearance of diffraction rings of samples from the two groups. Specifically, in vertebra samples from exposed rats (Figure 1; d,f) the electron diffraction rings appeared less bright and spotty than in the samples from control rats (Figure 1; c, e). These differences are due to a smaller size and lower crystallinity of apatite crystals forming the vertebrae in the PCB exposed treatment group compared to those of the control group.

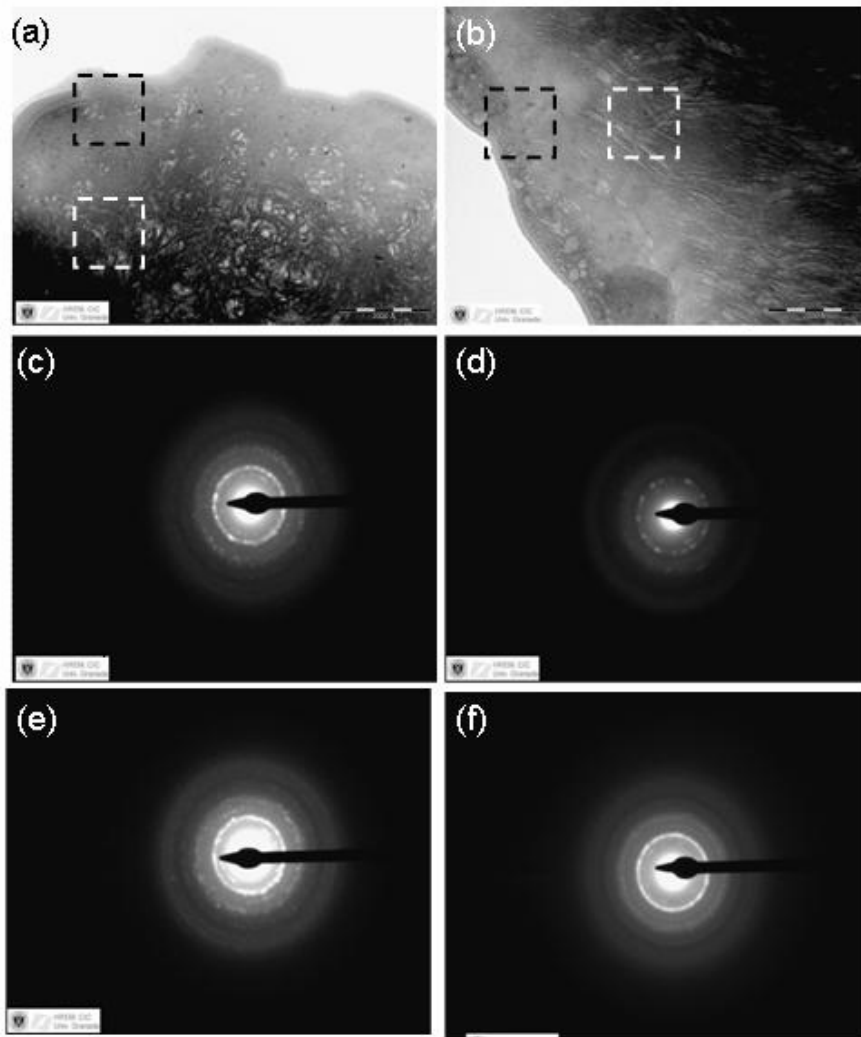


Figure 1. TEM analyses. TEM images and selected area electron diffraction patterns from the rat vertebral sections studied. (a,b) TEM images of bone vertebra (cortical region from the vertebral body) correspond to control and PCB126 groups, respectively. (c,d - black inset-) Electron diffraction patterns correspond to the same cortical regions - outer region- from the previously mentioned sections, control and exposed group, respectively. (e,f - white inset-) Electron diffraction patterns from the cortical region -inner region- of the sections, control and exposed group respectively. Note that the diffraction rings from the electron diffraction patterns correspond to the *PCB126 exposed rats* (d,f) appear less bright and less spotty than those from the *control* group (c,e).

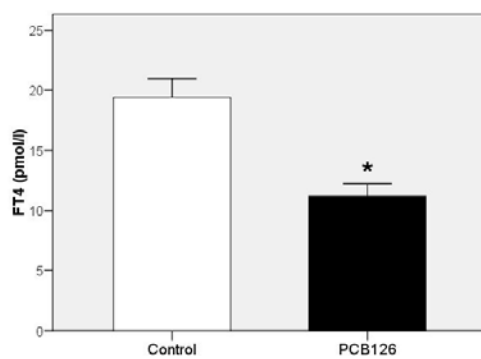
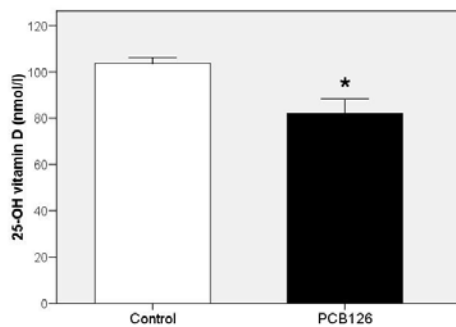
Serum analyses

- *Vitamin D*

The results from vitamin D levels in serum showed a significant decrease (- 21 %; $p < 0.005$) in the PCB126-exposed group (Figure 2).

- *Thyroxin levels*

The concentrations of two different TH forms (TT4 - total thyroxin- and FT4 - free total thyroxin-) were measured in serum from both groups. Compared with control, PCB-126 exposed rats had significantly lower TT4 and FT4 levels in serum. The FT4 and TT4 levels were 42 and 26 % lower, respectively ($p < 0.005$ in both cases) in the PCB126-exposed group (Figure 2).



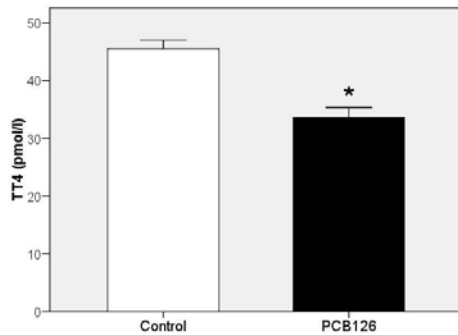


Figure 2. Vitamin D and thyroxin Hormone levels in serum

Figure 2A. The serum level of 25-OH vitamin D was significantly lower ($p < 0.005$) in Sprague-Dawley rats exposed to 3,3',4, 4', 5 - pentachlorobiphenyl (PCB 126, total dose 384 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) compared to control rat group. Values are presented as mean \pm SEM.

Figure 2B. The serum level of Free Total Thyroxin (FT4) was significantly lower ($p < 0.005$) in Sprague-Dawley rats exposed to 3,3',4, 4', 5 - pentachlorobiphenyl (PCB 126, total dose 384 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) compared to control rat group. Values are presented as mean \pm SEM.

Figure 2C. The serum level of Total Thyroxin (TT4) was significantly lower ($p < 0.005$) in Sprague-Dawley rats exposed to 3,3',4, 4', 5 - pentachlorobiphenyl (PCB 126, total dose 384 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) compared to control rat group. Values are presented as mean \pm SEM.

DISCUSSION

In the current study, we report that treatment with PCB126 significantly altered the chemical composition of vertebral bone mineral composition at the molecular level. Specifically, the mineral composition in the treated group showed a lower relative degree of mineralization than in the controls. Previous studies have described alterations in bone tissue due to 3,3',4,4', 5 pentachlorobiphenyl (PCB126) toxicity (Lind et al., 1999; Lind et al., 2000; Lind et al., 2004). Specifically, Lind *et al.* reported that PCB 126 may act as an endocrine disruptor, profoundly altering in long bones of

treated rats, provoking for instance increased cortical thickness and decreased collagen content of these bones (Lind et al., 1999; Lind et al 2000).

In a recent study on free-ranging birds living in environments polluted by organochlorines and mercury FTIR spectrometry revealed significant changes in bone mineral composition (Rodriguez-Navarro et al., 2006). In the present study, we report that treatment with a repeated exposure to PCB, under experimental conditions, significantly altered the chemical composition of vertebral bone mineral composition at the molecular level. Specifically, in exposed rats the degree of mineralization of vertebrae was lower than that in control group. These effects can be explained as an alteration in the bone remodelling process due to PCB toxicity-induced metabolic disruption. A recent study has also demonstrated how exposure to a mixture of PCBs, *Aroclor 1254*, provoked a catabolic effect by upregulating osteoclast and downregulating osteoblastic activity (Ramajayam et al., 2007). The effect noted in bone mineralization in the present study, due to PCB-induced exposure, may be directly related to an alteration of bone tissue homeostasis. In this sense, PCB126 may provoke oxidative stress, affecting normal bone turnover. This disturbance of bone mineralization, inferred from FTIR analyses, was related to a reduction in thyroid hormone and vitamin D levels in serum which regulation are critical for growth, differentiation and regulation of bone tissue.

A number of studies have proposed possible changes of the arrangements and diameter of collagen fibrils in osteoporotic bone both in rats (Kafantari et al., 2000; Rohanizadeh et al., 2000) and in humans (Rubin et al., 2003). Few other studies have analysed microstructural mineral changes in bone tissue related to exposure to chemicals. At the

mesostructural level, using TEM images and transmission electron diffraction patterns, we were able to assess the distribution of apatite crystals and their relative crystallinity in vertebral bone mineral. In this study, we observed that vertebrae from PCB126-exposure group showed a smaller density of crystals of reduced size (lesser spotty and bright diffraction peaks of apatite crystal) versus control group, which indicates a decreased mineralization in the vertebral bone tissue. This decline in mineralization of bone vertebra inferred from TEM analysis in the exposed group consistent with the degree of mineralization determined by FTIR. Since apatite crystals ordering and arrangements provide strength and elasticity to bone tissue, possible variations on the crystallinity properties may be related to differential properties on bone functions. In this respect, a variation on the nanostructural properties of bone apatite crystals due to PCB126 exposure might be an explanation to the previously observed reduced femur strength in rats exposed to PCB126 (Lind et al., 2000).

Additionally, we document that PCB exposure induced an alteration of the thyroid hormone levels in serum. Thyroid hormone (TT4, FT4) levels decreased in the serum of PCB126 exposed rats. Similar responses to PCBs and analogous compounds in thyroid hormone levels have been described (Brouwer, 1991; Gould et al., 1997; Rolland, 2000; Skaare et al., 2001; Tabuchi et al., 2006). This decrease in thyroxin levels might be explained by the displacement of or interference with plasma-binding proteins by PCB metabolites (Van der Berg et al., 1991; Rickenbacher et al., 1986). THs are known to play an important role in the development and turnover of bone mineral tissue. TH receptors regulate the activity of osteoblast and consequently mediate osteoclastic bone resorption (Ross, 1998). In the current study, bone loss associated with TH levels might result from increased bone turnover, as bone resorption is faster than

bone formation. This mechanism could explain the observed decline in the degree of bone mineralization detected by FTIR analyses.

Also, we found that exposure to PCB126 depressed vitamin D serum levels, a condition that could also cause an alteration in bone resorption rate. As in the case of thyroid hormones (TT4 and TF4), in the current study, PCB126 exposure induced a reduction in vitamin D serum levels. Although the mechanisms controlling these levels are not well known, this PCB-induced reduction in vitamin D serum concentrations may result in a diminished capacity to assimilate calcium, provoking a lower bone mineralization as also have been inferred from FTIR and TEM analyses. Vitamin D is a hormone that exerts a fundamental role in stimulating osteoclastic bone resorption (Jones et al., 1998). Its presence plays a critical effect in establishing the necessary balance of calcium and phosphorus to support bone mineralization. As a transcriptional regulator of bone matrix, vitamin D is involved in several processes of bone turnover and bone calcium mobilization. Few works have been reported PCB-induced effects on vitamin D metabolites. Lilienthal et al. (2000) reported a dose-dependent reduction in serum concentrations of vitamin D related with a PCB-mixture exposure. More recently, a study with a population of Baltic grey seals exposed to high PCB and DDT levels has shown bone lesions possibly associated with a contaminant-mediated vitamin D and thyroid disruption (Routti et al., 2008). The present study shows that depressed levels of vitamin D may upset serum calcium homeostasis and consequently lower the degree of mineralization of vertebral bone in exposed rats group.

In summary, the results from the application of the complementary techniques (TEM and FTIR) used in this study constitutes a suitable procedure to offer insights into possible bone mineralization alteration

due to the exposure to contaminants. The lowering of both the thyroxin and vitamin D serum levels might be an underlying explanation for the observed effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank “Centro de Instrumentación Científica” (University of Granada, Spain) and the staff for his technical support. This study was funded in part by grants from The Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Spatial Planning (FORMAS, 216-2006-1306) and from REN-2003-07375 and CTM-2007-65713 from Research Projects of the Spanish government.

REFERENCES

- Bassett, J.H.D., Nordström, K., Boyde, A., Howell, P.G.T., Kelly, S., Vennström, B., Williams, G.R., 2007. Thyroid status during skeletal development determines adult bone structure and mineralization. *Mol. Endocrinol.* 21 (8), 1893-1904.
- Bengtsson, B.E., Bengtsson, Å., Himberg, M., 1985. Fish deformities and pollution in some swedish waters. *Ambio* 14 (1), 32-35.
- Bergman, A., Olsson, M., Reiland, S., 1992. Skull-bone lesions in the Baltic grey seal (*Halichoerus grypus*). *Ambio* 21 (8), 517-520.
- Boskey, A.L., 2007. Mineralization of bones and teeth. *Elements* 3 (6) 385-391.
- Brandt, M., Siegel, M.I., 1978. The effects of stress on cortical bone thickness in rodents. *Am. J. Phys. Anthropol.* 49, 31-34.

Brouwer, A., 1991. Role of biotransformation in PCB-induced alterations in vitamin A and thyroid hormone metabolism in laboratory and wildlife species. *Biochem. Soc. T.* 19 (3), 731-737.

Byrne, J.J., Carbone, J.P., Hanson, E.A., 1987. Hypothyroidism and abnormalities in the kinetics of thyroid hormone metabolism in rats treated chronically with polychlorinated biphenyl and polybrominated biphenyl. *Endocrinology* 121 (2), 520-527.

Cheek, A.O., Kow, K., Chen, J., McLachlan, J.A., 1999. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. *Environ. Health Persp.* 107, 273-278.

Chu, I., Villeneuve, D.C., Yagminas, A., LeCavalier, P., Poon, R., Feeley, M., Kennedy, S.W., Seegal, R.F., Håkansson, H., Ahlborg, U.G., Valli, V.E., 1994. Subchronic toxicity of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in the rat. I. Clinical, biochemical, hematological, and histopathological changes. *Fund. Appl. Toxicol.* 22, 457-468.

Dietz, A.A., Steinberg, B., 1953. Chemistry of bone marrow. VIII. Composition of rabbit bone marrow in inanition. *Arch. Biochem. Biophys.* 45(1), 10-20.

Gierthy, J.F., Arcaro, K.F., Floyd, M., 1997. Assessment of PCB estrogenicity in a human breast cancer cell line. *Chemosphere* 34, 1495-1505.

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 (2), 221-230

Hallgren, S., Sinjari, T., Håkansson, H., Darnerud, P.O., 2001. Effects of polybrominated diphenylethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Arch. Toxicol.* 75, 200-208.

Hansen, L.G., 1999. *The Ortho Side of PCBs: Occurrence and Disposition*, Kluwer Academic Publishers.

Hoffman, D.J., Melancon, M.J., Klein, P.N., Rice, C.P., Eisemann, J.D., Hines, R.K., Spann, J.W., Pendleton, G.W., 1996. Developmental toxicity of PCB 126 (3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) in nestling American Kestrels (*Falco sparverius*). *Fund. Appl. Toxicol.* 34 (2), 188-200.

Jones, G., Strugnell, S.A., DeLuca, H.F., 1998. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol. Rev.* 78 (4), 1193-1231.

Kafantari, H., Kounadi, E., Fatouros, M., Milonakis, M., Tzaphlidou, M., 2000. Structural alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *Bone* 26 (4), 349-353.

Kannan, K., Nakata, H., 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. Tech.* 32, 1214-1221.

Krishnan, V., Safe, S., 1993. Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and Dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: Quantitative structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharm.* 120, 55-61.

Lilienthal, H., Fastabend, A., Hany, J., Kaya, H., Roth-Härer, A., Dunemann, L., Winneke, G., 2000. Reduced levels of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rat dams and offspring after exposure to a reconstituted PCB mixture. *Toxicol. Sci.* 57 (2), 292-301.

Lind, P.M., Eriksen, E.F., Sahlin, L., Edlund, M., Orberg, 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.

Lind, P.M., Larsson, S., Oxlund, H., Hakansson, H., Nyberg, K., Eklund, T., Orberg, 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.

Lind, P.M., Eriksen, E.F., Lind, L., Orberg 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.

Lind, P.M., Milnes, M.R., Lundberg, R., Bermudez, D., Orberg, J., Guillette, L.J. Jr., 2004. Abnormal bone composition in female juvenile American alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka, Florida). *Environ. Health Persp.* 112, 359-362.

Lundberg, R., Jenssen, B.M., Leiva-Presa, A., Rönn, 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 (7), 614-619.

Magnusson, K., Ekelund, R., Grabic, R., Bergqvist, P.-A., 2006. Bioaccumulation of PCB congeners in marine benthic infauna. *Mar. Environ. Res.* 61 (4), 379-395

Olsson, M., Karlsson, B., Ahnland, E., 1994. Diseases and environmental contaminants in seals from the Baltic and Swedish west coast. *Sci. Total Environ.* 154, 217-227.

Ramajayam, G., Sridhar, M., Karthikeyan, S., Lavanya, R., Veni, S., Vignesh, R.C., Ilangovan, R., Djody, S.S., Gopalakrishnan, V., Arunakaran, J., Srinivasan, N., 2007. Effects of Aroclor 1254 on femoral bone metabolism in adult male Wistar rats. *Toxicology* 241(3), 99-105.

Rickenbacher, U., McKinney, J.D., Oatley, S.J., Blake, C.C.F., 1986. Structurally specific binding of halogenated biphenyls to thyroxine transport protein. *J. Med. Chem.* 29 (5), 641-648.

Rohanizadeh, R., LeGeros, R.Z., Bohic, S., Pilet, P., Barbier, A., Daculsi, G., 2000. Ultrastructural properties of bone mineral of control and tiludronate-treated osteoporotic rat. *Calcified Tissue Int.* 67 (4), 330-336

Ross, D.S., 1998. Bone disease in hyperthyroidism. In: L V Avioli and S M Krane, Editors, *Metabolic Bone Disease*, Academic Press, San Diego, 531-544.

Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., Alvarez-Lloret, P., Gaines, K.F., 2006. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on clapper rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. *Environ. Sci. Technol.* 40 (16), 4936-4942

Rolland, R.M., 2000. A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *J. Wildlife Dis.* 36(4), 615-635.

Roth-Härer, A., Lilienthal, H., Bubser, M., Kronthaler, U., Mundy, W.R., Ward, T.R., Schmidt, W., Winterhoff, H., Winneke, G., 2001. Neurotransmitter concentrations and binding at dopamine receptors in rats after maternal exposure to 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl: The role of reduced thyroid hormone concentrations. *Environ. Toxicol. Phar.* 9 (3), 103-115.

Routti, H., Nyman, M., Janssen, B.M., Bäckman, C., Koistinen, J., Gabrielsen, G.W., 2008. Bone-related effects of contaminants in seals may be associated with vitamin d and thyroid hormones. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (4), 873-80.

Rubin, M.A., Jasiuk, I., Taylor, J., Rubin, J., Ganey, T., Apkarian, R.P., 2003. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. *Bone* 33 (3), 270-282.

Skaare, J.U., Bernhoft, A., Wiig, O., Norum, K.R., Haug, E., Eide, D.M., Derocher, A.E., 2001. Relationships between plasma levels of organochlorines, retinol and thyroid hormones from polar bears (*Ursus maritimus*) at Svalbard. *J. Toxicol Env. Heal. A.* 62(4), 227-241.

Sonne, C., Dietz, R., Born, E.W., Riget, F.F., Kirkegaard, M., Hyldstrup, L., Letcher, R.J., Muir, D.C.G., 2004. Is bone mineral composition disrupted by organochlorines in East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*)?. *Environ. Health Persp.* 112 (17), 1711-1716

Tabuchi, M., Veldhoen, N., Dangerfield, N., Jeffries, S., Helbing, C.C., Ross, P.S., 2006. PCB-related alteration of thyroid hormones and thyroid hormone receptor gene expression in free-ranging harbor seals (*Phoca vitulina*). *Environ. Health Persp.* 114 (7), 1024-1031.

Tanabe, S., 1988. PCB problems in the future: foresight from current knowledge, *Environ. Pollut.* 50, 5-28.

Van den Berg, K.J., van Raaij, J.A., Braga, P.C., Notten, W.R., 1991. Interactions of halogenated industrial chemicals with transthyretin and effects on thyroid hormone levels in vivo. *Arch. Toxicol.* 65(1), 15-19.

U.S. Environmental protection agency (USEPA), 1996. PCBs: a cancer dose response assessment and application to environmental mixtures.

***EFFECT OF LEAD-SHOT INGESTION ON BONE
MINERALIZATION IN A POPULATION OF
RED-LEGGED PARTRIDGE (*Alectoris rufa*)***

Pedro ALVAREZ-LLORET^a, Alejandro B. RODRIGUEZ-
NAVARRO^a, Christopher S. ROMANEK^b, Pablo FERRANDIS^c,
Rafael MATEO^d

^a *Department of Mineralogy and Petrology, University of Granada, Avda
Fuentenueva s/n, 18002 Granada, Spain*

^b *Department of Geology and Savannah River Ecology Laboratory, The
University of Georgia, Drawer E, Aiken, SC 29802.*

^c *Department Plant Production and Agricultural Technology, E.T.S.
Ingenieros Agrónomos, University of Castilla-La Mancha, Campus
Universitario s/n, 02071 Albacete, Spain*

^d *Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (CSIC, UCLM,
JCCM), Ronda de Toledo s/n, 13005 Ciudad Real, Spain*

MANUSCRIPT

ABSTRACT

The effect of lead toxicity on bone mineralization was investigated in a population of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) inhabiting a farmland area contaminated with lead-shot from recreational hunting activities in Albacete, a southeastern region of Spain. Femurs from 40 specimens of red-legged partridge were analyzed by Atomic Absorption (AAS) and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. The FTIR spectra of bone were analyzed in detail to determine different potential changes in bone chemistry due to lead toxicity. This data showed a marked decrease in mineralization as lead concentration in bone tissue increased. Stable isotope ratios of carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) were measured on bone samples to determine diet habits and their relationship with sources of lead contamination. Interestingly, there was a significant correlation between the $\delta^{13}\text{C}$ value and lead concentration of bulk bone which suggests a spatial/diet dependence on lead exposure levels. This study describes an innovative and sensitive methodology based on the use of bone to infer information about the health state of wild bird populations.

Keywords: bone, lead, FTIR, stable isotope, biomineralization, red-legged partridge

INTRODUCTION

Lead poisoning by shot ingestion is a widespread contamination problem affecting many wild bird species, especially those inhabiting areas of intense recreational hunting activities (Clark and Scheuhammer, 2003; Fisher et al., 2006). To implement alternative restorative/protective policies, it is important to evaluate first the availability of the lead-shot in the field and the direct impact of this type of contamination on the health of affected bird populations. Knowledge about the type and concentrations of contaminants in biological tissues (e.g. liver, kidney, bone) aids in identifying cases of poisoning or exposure to contaminants in the environment (Van Eeden and Schoonbee, 1996; Jeng et al., 1997; Wayland et al., 1999). Bone is probably one of the most useful and employed tissues to described long-term exposure to lead in birds during its life due to its slow turnover rate and because lead preferentially accumulate on bone (Wayland et al., 1999; Gangoso et. al., 2008).

Bone is a mineralized tissue composed mainly of packed collagen fibres and nano-sized hydroxylapatite crystals (Lowestan and Weiner, 1989). Several biological processes are involved in controlling bone tissue turnover and development. These processes can be altered by the state of health of the organism as well as other genetic and environmental factors (i.e., pollution). In fact, several toxicological studies have demonstrated how environmental pollutants may cause malformations and abnormal mineralization and composition of bone tissue (Puzas, 1992; Berglund et al., 2000; Lind et al., 2004). In particular, lead, as other heavy metals, may indirectly alter bone mineralization by provoking kidney dysfunction and thus altering vitamin D metabolism which is involved in Ca homeostasis (Scheuhammer, 1987). Additionally,

lead toxicity can directly affect bone mineralization by altering osteoblast and osteoclast functions (Pounds et al., 1991) and decreasing the activity of plasmatic alkaline phosphatase as have been observed in wild birds populations (Mateo et al., 2003a).

Several analytical techniques are available to assess changes in bone composition (Peters et al., 2000; Hassenkam et al., 2004; Olszta et al., 2007). FTIR spectrometry is particularly useful as it provides detailed qualitative and quantitative information about bone composition at the molecular level (e.g. relative carbonate and phosphate content in bone mineral tissue: Termine and Posner, 1966; Rey et al., 1991; Gadaleta et al., 1996; Miller et al., 2001; Boskey and Mendelsohn, 2005). The use of this method allows a better and more detailed comprehension of changes in mineralized tissues associated with different bone disorders.

We have studied a population of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) affected by lead contamination. In the farm land in which they inhabit there is a high density of spent lead-shots from hunting activities and partridges are exposed to lead by ingestion (Ferrandis et al., 2008). Liver and femur lead levels have been previously used in this population of red-legged partridges as an indicator of lead exposure in the studied area (Ferrandis et al., 2008). The main objective of this study is to determine the effects of lead exposure on the health of wild red-legged partridges by analyzing bone mineralization alterations. We have employed a combination of analytical techniques including atomic absorption spectroscopy (AAS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to evaluate the usefulness of bone tissue as an indicator of organism health. On the other hand, it is also important to identify

contaminant sources on ecosystems to take restorative and preventive actions for wildlife. In this respect, the stable isotope analysis of animal tissues is a powerful research tool in ecotoxicological studies that could be applied to reveal information about feeding or diet habit and their association to sources of contamination (Macko and Ostrom, 1994). The stable isotope ratios of nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) and carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) have been extensively used in ecological studies to determine the diet, trophic level, origin and migratory behavior of organisms and populations that inhabit ecosystems (Hobson and Welsh, 1992; Coplen, 1996; Kelly, 2000; Graves et al., 2002). The use stable isotopes could also help to elucidate alterations of physiological processes in organism due to the presence of pollutants in the environment (Shaw-Allen et al., 2005).

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study was carried out on a private upland small-game hunting estate located on ~3500 ha of farm in the south of La Mancha region, Albacete province, central-southeastern Spain. Red-legged partridge, the species focus of this study, is a common game bird species in South Western Europe, inhabits cropland, orchards, open woodlands and dry hilly land with scattered small bushes up to about 1300 m in montane foothills. Its diet consists of wild and cultivated grasses and forage legumes, mainly vetches *Vicia* sp., and other seeds and fruits on occasion; ants, grasshoppers and other insects (McGowan, 1994). The partridge hunting season extends from October to February. On the estate studied, partridges are hunted by driven shooting (“*ojeo*” in Spanish), a common and widespread technique in Spain. In this hunting technique,

gamebirds are flushed from plant cover with a line of hunters. Ammunition employed were cartridges of caliber No. 7 (or No. 6 to a lesser extent) mainly composed by lead pellets. The density of lead shot in soil of this hunting estate was 73,600 shot/ha (Ferrandis et al., 2008).

Sample collection

Ten individuals were collected in 2004 and fifty four were collected in 2006 for analyses. Sex of partridges was determined by gonad examination and juveniles (< 1 year) were identified by the presence of the bursa of Fabricius. Femur from red-legged partridges were excised and weighed after meticulously removing muscle using a scalpel. Small sections of bone samples were then cut from femur diaphysis. Bone sections were physically cleaned of marrow and rinsed with Milli-Q water. Samples were dried to a constant weight and grounded with a cryogenic mill (CertiPrep 6750 Freezer/Mill, SPEX).

Atomic Absorption Spectrometry (AAS)

For lead concentrations analysis, 20 mg of bone powder was weighed and digested with 1 ml of 70% nitric acid (Suprapur, Merk, Germany) at room temperature for 24 hours. Afterwards, 1 ml of 30% hydrogen peroxide (Suprapur, Merk, Germany) was added and then held digested at room temperature for 24h. The digested samples were diluted to a final volume solution of 10 ml with deionized water and lead concentration was analyzed using a graphite furnace atomic absorption spectrometry (AAS, Perkin-Elmer 5100). All lead concentrations are expressed as dry-weight. For quality control purpose, a standard reference sample was

measured every 5 samples. Reproducibility was better than 5% for standards. The limit of detection was approximately 0.01 ppm.

Fourier Transform Infrared (FTIR)

For the FTIR analyses, 5 mg of dried bone powder was mixed with 90 mg of FTIR-grade KBr and pressed under vacuum at 10 metric tons for 10 min. Infrared spectra were obtained on a FTIR Magna 200 Nicolet. Spectra were collected from 400 to 4000 cm^{-1} in absorbance mode. For each sample, 1024 scans were collected at 2 cm^{-1} resolution. All curve fitting was performed and integrated areas measured using the curve fitting software EZ-Omnic[®] and Systat Software Inc. PeakFit v4.11. The amount of phosphate, carbonate, collagen and lipids in bone were estimated from the peak area of absorption bands associated with phosphate, carbonate, amide and C-H aliphatic groups identified in the infrared spectra (Rey et al., 1991; Gadaleta et al., 1996; Paschalis et al., 1996; Boskey and Mendelsohn, 2005). Overlapping peaks were resolved using a second derivative methodology and fitted to a mixed derivative Gaussian and Lorentzian function. To minimize the effect of differences in sample size, peak areas were normalized to the area of 3800-2800 cm^{-1} band region associated with OH groups after removing the C-H stretching peak area from this region. All data are baseline corrected and expressed as intensities ratios. The resulting area ratios are represented by a capital "A", followed by the peak or band position (e.g., A1660, A1405). A detailed description of the methodology employed is described elsewhere (Rodriguez-Navarro et al., 2006). Error in the determination of the normalized peak areas was measured by repeatedly measuring the same sample 10 times obtaining an error less of 10%. The following parameters were

developed to describe bone composition and crystallinity from the FTIR spectra analyses:

The degree of bone mineralization (*mineral*) was defined as the band intensity ratios of phosphate species in the bone mineral to organic matrix ratio (Pienkowski et al., 1997) and was estimated as follows:

$$mineral = A_{900-1200} / A_{1660} \quad [1]$$

where A₉₀₀₋₁₂₀₀ represent the amount of phosphate in bone and A₁₆₆₀ the amount of amide I groups (main band from bone organic matrix; Boskey, 1999). This ratio demonstrated to be related to the mineral content of bone (ash weight; Faibish et al., 2005).

The crystallinity index (*CI*) was calculated as the ratio of the peak area at 1030 cm⁻¹ (highly crystalline apatite) to 1010 cm⁻¹ (poorly crystalline apatite; Miller et al., 2001):

$$CI = A_{1030} / A_{1010} \quad [2]$$

The relative amount of carbonate in bone mineral (*minCO₃*) was calculated as the ratio of the peak area at 1405 cm⁻¹ (carbonate type B substitution, Rey et al., 1989) to phosphate band area (A₉₀₀₋₁₂₀₀):

$$minCO_3 = A_{1405} / A_{900-1200} \quad [3]$$

Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)

For carbon and nitrogen stable isotope ratio analysis, approximately 1 mg of bone powder from each specimen was loaded in a tin capsule, sealed and loaded in the autosampler of a Carlo Erba Elemental Analyzer NA2500 interfaced to an isotope ratio mass spectrometer (Delta Plus XL ; Finningan, Germany). Samples were

combusted to CO₂ and N₂ and their nitrogen (¹⁵N/¹⁴N) and carbon (¹³C/¹²C) isotopic ratios were determined using the mass spectrometer. An external standard, Dogfish muscle and liver, (Dorm-2; National Research Council of Canada), calibrated to the international standard VPDB, was used to estimate the precision of the isotopic analysis and were reproducible to ± 0.062 and ± 0.093, for δ¹⁵N and δ¹³C, respectively.

Stable isotope compositions are reported using delta (δ) notation (Kelly, 2000):

$$\delta X = (R_{\text{sample}} / R_{\text{std}} - 1) \cdot 1000$$

where δX is delta value of the sample relative to the reference standard and, R_{sample} and R_{std} represent the isotope ratios of the sample and standard, respectively. Delta values are reported in per mil (‰) units.

Statistical analysis

All parameters calculated were normally distributed (Shapiro-Wilk $p < 0.001$) except lead concentration which was normalized through a logarithmic transformation. The relationships between data obtained were characterized through a multivariate analysis of variance. Correlations between values of lead concentrations and *mineral*, *CI*, *minCO₃* (inferred from FTIR) and stable isotope analyses (as δ¹⁵N and δ¹³C values) were explored by Pearson correlation analyses (one-tailed test). Differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using the software packages SPSS 13.0 (SPSS Inc.) and OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation).

RESULTS

Lead concentration in bone ranged from non detected values to 31.37 ppm with a mean concentration of 2.91 ppm. Six samples were below instrumental detection limits and one specimen had an abnormally high lead concentration of 31.37 ppm such an acute lead exposure/absorption as have been described in birds which died by lead poisoning (Pain et al., 1993). Since this study was aimed to study sublethal effects of lead poisoning the later sample was excluded for subsequent statistical analyses. Neither year of sampling, age, or sex influenced lead concentrations in bone. The lead concentrations and values of main compositional parameters determined by FTIR and IRMS are summarized in Table 1.

Table 1. Summary of the results obtained by Atomic Absorption Spectrometry (AAS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS).

		Mean \pm SD	Minimum	Maximum
AAS (ppm)	Lead	2.91 \pm 4.88	n.d.	31.37
FTIR	<i>mineral</i>	1.38 \pm 0.17	1.02	1.79
	<i>minCO3</i>	0.13 \pm 0.20	0.10	0.21
	<i>CI</i>	1.13 \pm 0.13	0.84	1.43
IRMS (‰)	$\delta^{15}\text{N}$	5.18 \pm 1.34	3.30	7.78
	$\delta^{13}\text{C}$	-20.49 \pm 1.09	-22.97	-18.22

Minimum value in AAS analysis (*n.d.*) means below detection limit.

The degree of mineralization (*mineral*), carbonate content (*minCO3*) and Crystallinity Index (CI) of partridge bone ranged from 1.02 to 1.79, from 0.10 to 0.21 and from 0.84 to 1.43, respectively. The nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) stable isotope values in bone samples ranged from 3.30 ‰ to 7.78 ‰ and from -22.97 ‰ to -18.22 ‰, respectively.

Correlations analyses among determined parameters revealed that there is a significant negative correlation between the degree of mineralization (*mineral*) and bone lead concentration ($R = -0.207$; $p = 0.048$; $N = 39$; Figure 1, Table 2). Interestingly, the $\delta^{13}\text{C}$ values showed a significant negative correlation with lead concentrations ($R = -0.281$; $P < 0.041$; $N = 39$; Fig 2, Table 2). On the other hand, the $\delta^{15}\text{N}$ values did not show any significant correlation with lead concentration. Carbon and nitrogen stable isotopic composition of bone samples strongly co-varied ($R = -0.591$; $P < 0.001$; $N = 39$; Table 2). Likewise, a significant correlation was observed between $\delta^{15}\text{N}$ values and *CI* ($R = 0.277$; $P < 0.044$; $N = 39$; Table 2).

Table 2. Correlation analyses of different bone properties (inferred from AAS, FTIR and IRMS) and lead load determined in red-legged partridges.

			log (Pb)	CI	mineral	minCO3	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$
AAS	log (Pb)	R	1.000	-0.146	-0.270	-0.015	0.138	-0.281
		P		0.188	0.048	0.464	0.202	0.041
		N	39	39	39	39	39	39
FTIR	CI	R		1.000	0.131	-0.177	0.277	-0.209
		P			0.213	0.141	0.044	0.101
		N		39	39	39	39	39
	mineral	R			1.000	0.259	0.241	0.023
		P				0.055	0.070	0.444
		N			39	39	39	39
IRMS	minCO3	R				1.000	-0.098	0.150
		P					0.277	0.181
		N				39	39	39
	$\delta^{15}\text{N}$	R					1.000	-0.591
		P						>0.001
		N					39	39
	$\delta^{13}\text{C}$	R						1.000
		P						
		N						39

Properties and values of Pearson correlation coefficients (R) at $P < 0.05$ are highlighted in bold. N is the number of observations.

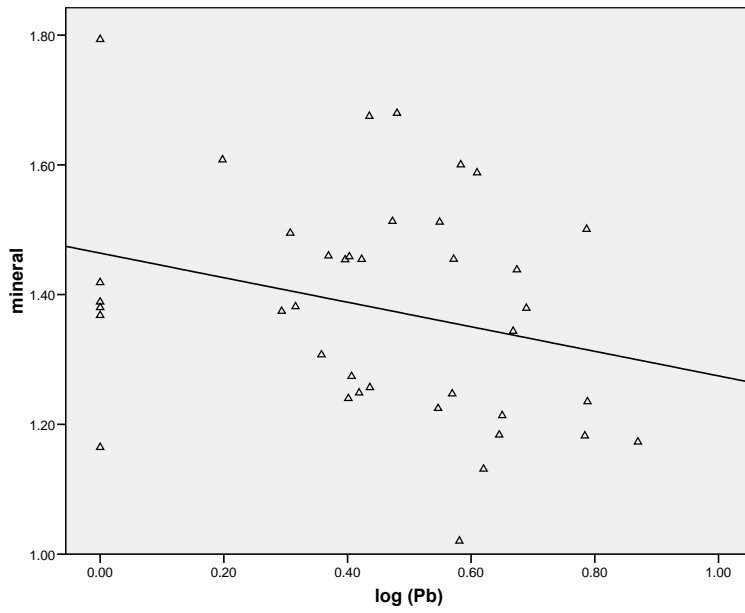


Figure 1. Degree of bone mineralization as a function of lead concentration in bone from red-legged partridge.

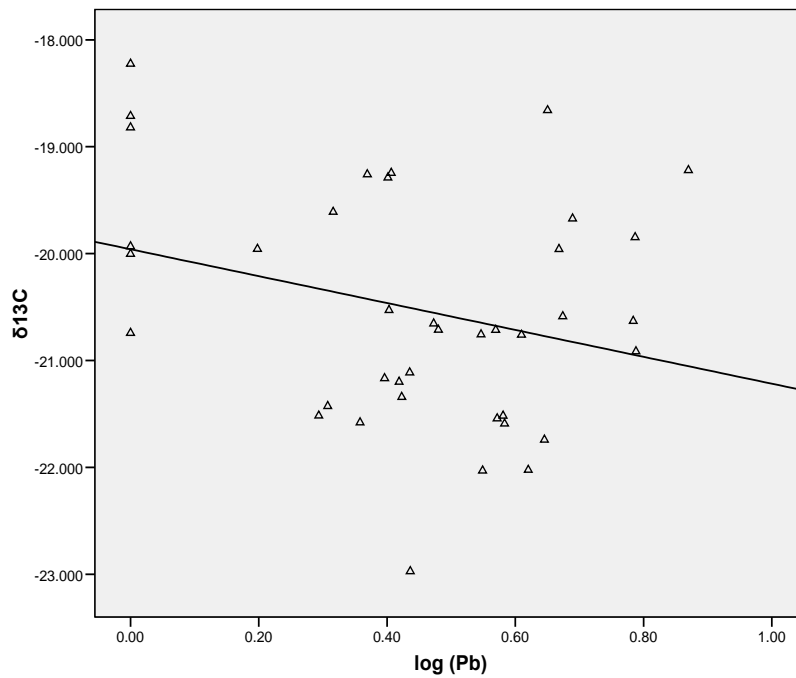


Figure 2. Values of $\delta^{13}\text{C}$ as a function of lead concentration in bone from red-legged partridge.

DISCUSSION

This investigation is a continuation of an ongoing study aimed to quantify the impact of lead contamination on a hunting state using red-legged partridges as an indicator species of this ecosystem. In a previous study (Ferrandis et al., 2008), we have focused on the accumulation and spatial pattern of spent lead shots and their relationship to the prevalence of shot ingestion in red-legged partridges and their lead body burden. It was found that up to 20 % of partridges sampled have lead shot ingested in one of the years studied indicating that ingestion is a major pathway for lead exposure in partridge. Eventhough partridges were exposed to significant lead levels, the previous study failed to detect any notable effects on any of the health indicators analyzed (i.e., body condition, organ weight, abdominal fat). The lack of effects, even though the significant lead levels, was attributed to the fact that partridge, being a galliform species, may be more resistant to lead toxicity than other more sensitive species (i.e., altricial birds; Scheuhammer, 1987).

The present study focuses on the use of bone composition as a sensitive indicator of the effect that toxicants can have on the overall health of partridges. This tissue can proportionate information which can not be easily obtained using more traditional health indicators. The main contaminant in the study site is lead from spent shots which are found at high density (73600 units/ha) in the area (Ferrandis et al., 2008). Lead is readily available and is found at relatively elevated level in bone tissue of partridges collected during different years indicating that partridges have been exposed to this toxicant during their whole life.

Previous studies indicate that lead, as other heavy metals, can alter the correct mineralization of bone tissue playing also a significant role in the development of bone pathologies (Puzas, 1992; Smits et al., 2005). In the current study, lead levels found in bone from red-legged partridge indicate a chronic exposure. The correlation analyses showed that exposure to lead may have altered bone chemical composition by altering the degree of bone mineralization, which decreased with lead levels. This could be due to a modification of normal bone metabolism induced by lead exposure (Schirrmacher et al., 1998). Previous studies have described Pb poisoning in many birds of prey and vultures (Pain and Amiard-Triquet, 1993; Mateo et al., 2001; Mateo et al., 2003b). Several works have described how lead poisoning can affect different metabolism processes (i.e., Ca metabolism) and organs (i.e., kidneys, nervous system) (Hoffman et al., 1985; Grue et al., 1986). Less attention has been paid to the negative effects of lead exposure on bone mineralization. Lead can cause skeletal defects and alter bone mineralization by reducing plasma levels of active vitamin D and parathyroid hormone (Mahaffey et al., 1982; Pounds et al., 1991). Likewise, lead intoxication also directly affects osteocalcin production, a marked protein of bone formation activity, and thus, bone-mineralization (Long et al., 1990). Specifically, lead impairs normal calcium homeostasis in cells and calcium messenger systems, which regulation is essential for normal cell function, and, consequently, inappropriately perturbing Ca regulated processes (Dowd et al., 2001). All these alterations could have induced an abnormal mobilization of calcium and the observed demineralization of bone. In fact, lead exposure, as other heavy metals such as cadmium or aluminum, is considered an environmental risk factor for osteoporosis (Goyer et al., 1994).

The carbon and nitrogen stable isotope composition of organism's tissues is directly related to the isotopic composition of the diet (DeNiro and Epstein, 1978; Tieszen et al., 1983; Lajtha and Michener, 1994). Thus, changes in the isotope composition of tissues reflect changes in feeding habits or migratory behavior as different food items have different isotopic composition. In our case, the partridge population lived in a relative small farmland area (3500 ha) and fed on the seeds and grains available in this area nearby to the hunting activities domains. It is probably that specimens showing greater lead levels fed preferentially in specific locations within their home range which were more lead contaminated than other adjacent areas and have vegetation with different $\delta^{13}\text{C}$ values. In this sense, the food items in these areas could have a more negative carbon isotope composition explaining the observed relationship with lead levels. In fact, non homogeneous spatial patterns of shot pellets and accumulation have been observed in the soil of this area (Ferrandis et al., 2008). Dispersion of lead spent shot-pellets was heterogeneous. Shots were less abundant close to irrigated cornfields while shot densities in dryland-shrubland ecotones were higher. In this manner, habitats with higher red-legged partridge populations may coincide with places where the higher hunt activities, near the shooting-lines, caused an increased lead shot concentrations in the soil.

In summary, in our study we have used bone (femur) of red-legged partridge to investigate the effects of lead exposure on bone mineralization in a wild bird population of red-legged partridge. Data obtained from FTIR spectroscopy revealed a clearly negative correlation between the degree of bone mineralization and lead bone concentration. On the other hand, our stable-isotope analyses of

bone demonstrate how this approach can provide additional information about contamination sources or possible metabolic alteration in organisms induced by contaminants. Additionally, this study has important implications for conservation management as it describes an innovative and sensitive methodology based on the use of bone to infer information about the health state of wild bird populations.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank “Centro de Instrumentación Científica” (University of Granada, Spain) and the technicians for sample analysis. This study was supported by Research Projects of the Spanish government: REN-2003-07375 and CTM2007-65713.

REFERENCES

Berglund, M., Akesson, A., Bjellerup, P., Vahter, M., 2000. Metal-bone interactions. *Toxicology Letters* 112-113, 219-225.

Boskey, A.L. Mineralization, Structure and function of bone, in *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. Eds. M.J. Seibel, S.P. Robins, J.P. Bilezikian, Academic press, San Diego, 1999. p. 153-164.

Boskey, A.L., Mendelsohn, R., 2005. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vibrational Spectroscopy* 38, 107-114.

Clark, A.J., Scheuhammer, A.M., 2003. Lead poisoning in upland foraging birds of prey in Canada. *Ecotoxicology* 12, 23-30.

Coplen, T.B., 1996. New guidelines for reporting stable hydrogen, carbon and oxygen isotope-ratio data. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60, 3359-3360.

DeNiro, M.J., Epstein, S. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495-506.

Dowd, T.L., Rosen, J.F., Mints, L., Gundberg, C.M., 2001. The effect of Pb(2+) on the structure and hydroxyapatite binding properties of osteocalcin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1535,153-163.

Faibish, D., Gomes, A., Boivin, G., Binderman, I., Boskey, A., 2005. Infrared imaging of calcified tissue in bone biopsies from adults with osteomalacia. *Bone* 36, 6-12.

Ferrandis P, Mateo R, López-Serrano FR, Martínez-Haro M, Martínez-Duro E.. 2008. Lead-shot exposure in red-legged partridge (*Alectoris rufa*) on a driven shooting estate. *Environmental Science & Technology* 42, 6271-6277.

Fisher, I., Pain, D.J., Thomas, V.A., 2006. Review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. *Biological Conservation* 131, 421-432.

Gadaleta, S.J., Paschalis, E.P., Betts, F., Mendelsohn, R., Boskey, A.L., 1996. Fourier transform infrared spectroscopy of the solution mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: new correlations between X-ray diffraction and infrared data. *Calcified Tissue International* 58, 9-16.

Gangoso, L., Álvarez-Lloret, P., Rodríguez-Navarro, A.B., Mateo, R., Hiraldo, F., Donazar, J.A., 2008 Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources. *Environmental Pollution (In press)*

Goyer, R.A., Epstein, S., Bhattacharyya, M., Korach, K.S., Pounds, J., 1994. Environmental Risk Factors for Osteoporosis. *Environmental Health Perspectives* 102, 390-394.

Graves, G.R., Romanek, C.S., Navarro, A.R., 2002. Stable isotope signature of philopatry and dispersal in a migratory songbird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8096-8100.

Grue, C.E., D.J. Hoffman, D.J., Beyer, W.N., Franson, L.P., 1986. Lead exposure and reproduction in highway-nesting Barn Swallows. *Environmental Pollution* 42, 157-182.

Hassenkam, T., Fantner, G.E., Cutroni, J.A., Weaver, J.C., Morse D.E., Hansma, P.K., 2004. High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. *Bone* 35, 4-10.

Hobson, K.A., Welsh, H.E., 1992. Determination of trophic relationships within Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Marine Ecology Progress Series* 84, 9-18.

Hoffman, D.J., Franson, J.C., Pattee, O.H., Bunck, C.M., Anderson, A., 1985. Survival, growth and accumulation of ingested lead in

nestling American kestrels (*Falco sparverius*). Archives Environmental Contamination. & Toxicology 14, 89-94.

Jeng, S.L., Lee, S.J., Liu, Y.F., Yang, S.C., Liou, P.P., 1997. Effect of lead ingestion on concentrations of lead in tissues and eggs of laying Tsaiya ducks in Taiwan. Poultry Science 76, 13-16.

Kelly, J.F., 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. Can. J. Zoo. 78, 1-27.

Lajtha, K., Michener, R.H., 1994 Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Lind, P.M., Milnes, M.R., Lundberg, R., Bermudez, D., Örberg, J., Guillette L.J.Jr., 2004. Abnormal bone composition in female juvenile american alligators from a pesticide-polluted lake (lake apopka, Florida). Environ Health Perspect. 112, 359-62.

Long G.J., Rosen, J.F., Pounds, J.G., 1990. Lead impairs the production of osteocalcin by rat osteosarcoma (ROS 17 2.8) cells. Toxicology and Applied Pharmacology 106, 270-277.

Lowenstam, H.A., Weiner S. (1989) On Biomineralization-Oxford Univ. Press, New York.

Macko S.A., Ostrom, N.E., 1994. Pollution studies using stable isotopes In: K. Lajtha and R.H. Michener, Editors, Stable isotopes in Ecology, Blackwell Scientific, London pp. 42-65.

Mateo, R., Cadenas, R., Máñez, M., Guitart, R., 2001. Lead shot ingestion in two raptors species from Doñana, Spain. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 48, 6-10.

Mateo, R., Beyer, W.N., Spann, J.W., Hoffman, D.J., 2003a. Relation of fatty acid composition in lead-exposed mallards to fat mobilization, lipid peroxidation and alkaline phosphatase activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 135, 451-8.

Mateo, R., Taggart, M., Meharg, A.A., 2003b. Lead and arsenic in bones of birds of prey from Spain. *Environmental Pollution* 126, 107 - 114.

Mahaffey, K.R., Rosen, J.F., Chesney, R.W., Peeler, J.T., Smith, C.M., DeLuca, H.F., 1982. Association between age, blood lead concentration and serum 1,25 dihydroxycholecalciferol levels in children. *Am. J. Clin. Nutr.* 35, 1327-1331.

McGowan, P.J.K., 1994. Family Phasianidae (pheasants and partridges). In: Del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J. (eds.) *Handbook of the Birds of the World. Vol. 2. New World Vultures to Guineafowl.* Lynx Edicions, Barcelona, pp. 434-552.

Miller, L.S., Vairavamurthy, V., Chance, M.R., Mendelsohn, R., Paschalis, E.P., Betts, F., Boskey, A.L., 2001. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared microspectroscopy of the ν_4 PO₄⁻ vibration. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1527, 11-19.

Olszta, M.J., Cheng, X., Jee, S.S., Kumar, R., R., Kim, Y., Kaufman, M.J., Douglas, E.P., Gower L.B., 2007. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58, 77-116.

Pain, D.J., Amiard-Triquet, C., 1993. Lead poisoning in raptors in France and elsewhere. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25, 183-192.

Paschalis, E.P., Jacenko, O., Olsen, B., Mendelsohn, R., Boskey, A.L., 1996. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis identifies alterations in mineral properties in bones from mice transgenic for type X collagen. *Bone* 19, 151-156.

Peters, F., Schwarz, K., Epple, M., 2000. The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis. *Thermochimica Acta* 361, 131-138.

Pienkowski, D., Doers, T.M., Monier-Faugere, M.-C., Geng, Z., Camacho, N.P., Boskey, A.L., Malluche, H.H., 1997. Calcitonin alters bone quality in beagle dogs. *Journal of Bone and Mineral Research* 12, 1936-1943

Pounds, J.G., Long, G.J., Rosen, J.F., 1991. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environmental health perspectives* 91, 17-32.

Puzas, J.D., Sickel, M.J., Felter, M.E., 1992. Osteoblasts and chondrocytes are important target cells for the toxic effects of lead. *Necro Toxicology* 13, 783-788.

Rey C., Collins, B., Goehl, T., Dickson, I.R., Glimcher, M., 1989. The carbonate environment in bone mineral: A resolution enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study. *Calcified Tissue International* 45, 157-164.

Rey, C, Renugopalakrishnan, V., Shimizu, M., Collins, B., Glimcher, M.J., 1991. A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃²⁻ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation. *Calcified Tissue International* 49, 259-268.

Rodriguez-Navarro, A.B., Romanek, C.S., Alvarez-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. *Environmental Science and Technology* 40, 4936- 4942.

Scheuhammer, A.M., 1987. The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: A review. *Environmental Pollution* 47, 263- 295.

Schirrmacher, K., Wiemann, M., Bingmann, D., Büsselberg, D., 1998. Effects of lead, mercury, and methyl mercury on gap junctions and [Ca²⁺]_i in bone cells. *Calcified Tissue International* 63, 134-139.

Shaw-Allen, P.L., Romanek, C.S., Bryan Jr., A.L., Brant, H., Jagoe, C.H., 2005. Shifts in relative tissue $\delta^{15}\text{N}$ values in snowy egret nestlings with dietary mercury exposure: A marker for increased protein degradation. *Environmental Science and Technology*. 39, 4226-4233.

Smits, J., Bortolotti, G., Baos, R., Blas, J., Hiraldo, F., Xie, Q., 2005. Skeletal pathology in white storks (*Ciconia ciconia*) associated with heavy metal contamination in southwestern Spain. *Toxicologic Pathology* 33, 441-448.

Termine, J. D., Posner, A.S., 1966. Infrared analysis of rat bone: age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions. *Science* 153, 1523-1525.

Tieszen L.L., Boutton T.W., Tesdahl K.G., Slade N.A., 1983. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for ^{13}C analysis of diet. *Oecologia* 57, 32-37.

Van Eeden, P.H., Schoonbee, H.J., 1996. Metal concentrations in liver, kidney, bone and blood of three species of birds from a metal-polluted wetland. *Water SA* 22, 351-358.

Wayland, M., Neugebauer, E., Bollinger, T., 1999. Concentrations of lead in liver, kidney, and bone of bald and golden eagles. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 37, 267-272.
