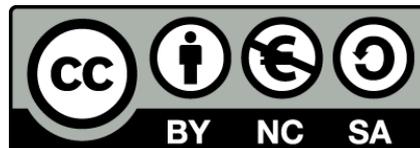




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## ***Apodemus sylvaticus* como centinela de fuentes de contaminación complejas**

Joaquín de Lapuente Pérez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartit Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartit Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**

***Apodemus sylvaticus***  
**como centinela de fuentes de contaminación**  
**complejas**

---



**Joaquín de Lapuente Pérez**  
**Tesis Doctoral, 2019**

---





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Facultat de Biologia

Departament de Biologia Animal

Programa de Doctoral de Biodiversitat

***Apodemus sylvaticus***  
**como centinela de fuentes de contaminación  
complejas**

Memoria presentada por  
**Joaquín de Lapuente Pérez**  
Para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona  
Barcelona, junio de 2019

El doctorando,

Joaquín de Lapuente Pérez

Director de tesis

Tutora de tesis

**Miquel Borràs Suárez**

**Carolina Sampera Trigueros**



Seré...



## Agradecimientos

---

El principio del final. Redactar los agradecimientos, significa que el trabajo está por concluir, que ves algo de luz al final de este largo, largo camino. Ha llovido desde que empecé a colgarme la mochila de la tesis y llegados a este punto, estos párrafos son los que se hacen más difíciles de redactar.

Son muchas, muchísimas las personas que me han animado a redactar esta tesis, pero si a alguien debo este momento es a mis padres por su incondicional apoyo a lo largo de estos años. La familia es la parte que más sufre la redacción, especialmente el último periodo. Con gran cariño he de agradecerse a mi hijo Oriol que ha sido la fuente de energía que me ha ayudado a llegar al final. Por supuesto, a mis hermanos, a Julieta y a Encarna por estar ahí, por los ánimos y la ayuda durante esta última fase. No puedo olvidar, en estos momentos, a Angelita por el apoyo y los ánimos que me ha transmitido.

Al Dr. Jacint Nadal, por aceptarme en su grupo, por su confianza en mí, por sus consejos, por su ciencia y por el incesante apoyo que he recibido por su parte, además de por querer formar parte del tribunal.

Al Dr. Miquel Borràs, porque si algo sé de este fascinante mundo de la toxicología, es gracias a él. Conocer a Miquel y tenerlo como jefe, maestro, toxicólogo, colega científico y amigo, ¡puedo confesar que ha sido y es un regalo!

Otra de las personas que marcaron mis inicios y a la que quiero dedicar una mención especial es a Roser Cruz, sin ella hubiera sido difícil llegar donde he llegado. Mis más sinceros agradecimientos a Milena Acosta, Javier González, Joan Serret, Damir García, David Ramos, Alce Coloma, Lydia Camps, Constança Porredón, Marta y Auri, Laura de Marzi, Montse Solà, Natalia, Valentinas, ... por tantos y tantos buenos momentos. No me olvido de los más de 100 utoxian@s que formamos parte de ese gran laboratorio.

A todos los compañer@s del Departamento de Biología Animal, pero muy en especial a Jordi Peig, por quien conocí a *Apodemus sylvaticus*, por ser mi guía inicial y por sus palabras y apoyo incesante, a Sergi Herrando y Lluís Brotons, a Eulalia, a Rosa Gómez, a Noelia y como no, a María Aránzazu Mendiola que, sin su desinteresada aportación, parte de esta tesis no se hubiera podido llevar a cabo. Quiero agradecer y hacer especial mención a Alex Sánchez-Chardí por todas sus aportaciones y, en especial, por los momentos vividos durante parte de este proyecto que sin su colaboración no hubiera sido posible. No podría dejar pasar tampoco a María Jesús López, Carola Sampera y Dolors Vinyoles por su paciencia, comprensión y ánimos.

Al Dr. Joan María Llobet por sus sabios y profesionales consejos, al Dr. Jesús Gómez por su particular forma de hacer sencillo lo más complicado, pero sin olvidar a Marta Barenys, Elisabet Teixido, Ester Piquer, Nuria Boix, Nati, el Dr. Rodamilans y a todos aquellos ceretoxic@s que mi corta memoria no alcanza a recordar.

Soy consciente de que me dejo a muchísimas personas sin mencionar. Es para tod@s ell@s para quien va este merecido agradecimiento por sus ánimos para enrolarme en esta aventura. A todos los que me han apoyado una vez he estado en ella. A todos los que me han preguntado por “¿cómo va la tesis?” en algún momento. A todos los que se han interesado por cuando acababa, a los que quedaron por el camino, a los que animaban cuando flaqueaban las fuerzas, a todos los que han comprendido lo que significa este momento y a todo aquel que ha hecho posible que me sienta razonablemente orgulloso de este trabajo.

## RESUMEN

---

La entrada en el medioambiente de xenobióticos, procedentes de la actividad humana, que son biológicamente activos y de difícil eliminación, representa un grado de estrés que, a menudo, resulta inaceptable por los organismos y que con, demasiada frecuencia, se eleva a nivel del ecosistema. Es, por tanto, necesario realizar una vigilancia activa de las fuentes de contaminación conocidas para detectar, de la manera más rápida y fiable posible, las señales de alarma que envían los ecosistemas. Los animales denominados centinelas, a su vez, por su capacidad de integrar la información del hábitat, tanto en el espacio como en el tiempo, pueden actuar como señales de alarma ecológica temprana. Por otro lado, para evaluar el impacto de los peligros por sustancias químicas en los ecosistemas, se han establecido modelos regulatorios que permiten predecir el grado de exposición a la que los organismos estarán expuestos para finalmente evaluar el riesgo. Este abordaje estandarizado, a menudo, ha construido sus algoritmos en base a los valores límites establecidos en ensayos, en condiciones controladas, con modelos de experimentación conocidos. Sin embargo, dada la dotación enzimática, la fisiología o la flora intestinal específica de cada especie y las propiedades toxicocinéticas de los compuestos químicos expuestos, las respuestas pueden variar, por lo que, la extrapolación de los efectos tóxicos de unos organismos a otros debe ser conocida. Para ello, se ha propuesto, por un lado, al ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, como centinela de contaminación ambiental de tipo crónica, difusa y compleja por su ubicuidad, su prospección del hábitat y su tolerancia a los contaminantes. Con este objetivo se caracterizó, mediante biomarcadores de exposición y de efecto, al ratón de campo en tres depósitos controlados de residuos de diferentes orígenes y en zonas agrícolas donde se habían vertido lodos de depuradora como fuente de nutrientes. Por otro lado, se utilizó a *Apodemus sylvaticus* como modelo de experimentación en mesocosmos, a fin de comprender y comparar la respuesta a la exposición de xenobióticos conocidos, con el fin de integrar y mejorar la capacidad predictiva de los modelos. Los resultados han permitido confirmar que el ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, es capaz de integrar información de la contaminación ambiental mediante el estudio de biomarcadores exposición y de efecto, ya que la exposición a fuentes de contaminación de diversos orígenes produjo una respuesta cuantitativa y diferencial entre las diversas zonas de estudio. De igual manera, *Apodemus sylvaticus*, ha aportado información relevante sobre los tipos de efectos observados, tras la exposición a un tóxico polar o a un tóxico de carácter lipofílico, en estudios en mesocosmos, al ser comparado con *Mus musculus domesticus*, como modelo experimental conocido. Por tanto, podemos concluir que el ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, es un modelo fiable como centinela de contaminación ambiental, capaz de integrar de manera cuantificable la exposición a xenobióticos.



# Índice

---

<i>Listado de Tablas</i> .....	<i>vii</i>
<i>Listado de Figuras</i> .....	<i>ix</i>
<i>Listado de Abreviaturas</i> .....	<i>xi</i>
<b>1</b> <i>Introducción</i> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <i>Objetivos</i> .....	<b>13</b>
<b>3</b> <i>Apodemus sylvaticus como centinela de fuentes de contaminación complejas: Depósitos Controlados de residuos sólidos</i> .....	<b>15</b>
<b>3.1</b> <i>Introducción</i> .....	<b>15</b>
<b>3.2</b> <i>Material y Métodos</i> .....	<b>33</b>
<b>3.3</b> <i>Resultados</i> .....	<b>37</b>
<b>3.4</b> <i>Discusión</i> .....	<b>54</b>
<b>3.5</b> <i>Conclusión</i> .....	<b>63</b>
<b>4</b> <i>Apodemus sylvaticus como centinela de fuentes de contaminación complejas: Vertidos de lodos de depuradora.</i> .....	<b>65</b>
<b>4.1</b> <i>Introducción</i> .....	<b>65</b>
<b>4.2</b> <i>Material y Métodos</i> .....	<b>67</b>
<b>4.3</b> <i>Resultados</i> .....	<b>70</b>
<b>4.4</b> <i>Discusión</i> .....	<b>76</b>
<b>4.5</b> <i>Conclusión</i> .....	<b>80</b>
<b>5</b> <i>Estudio comparativo entre dos especies: Apodemus sylvaticus y Mus musculus domesticus tras la administración de un tóxico hidrofílico (dicromato potásico) y un tóxico lipofílico (tricloroetileno)</i> .....	<b>81</b>
<b>5.1</b> <i>Introducción</i> .....	<b>81</b>
<b>5.2</b> <i>Material y Métodos</i> .....	<b>88</b>
<b>5.3</b> <i>Resultados</i> .....	<b>90</b>
<b>5.4</b> <i>Discusión</i> .....	<b>100</b>
<b>5.5</b> <i>Conclusiones</i> .....	<b>105</b>
<b>6</b> <i>DISCUSIÓN GENERAL</i> .....	<b>107</b>

<b>7</b>	<b><i>CONCLUSIONES</i></b> .....	<b>115</b>
<b>8</b>	<b><i>Bibliografía</i></b> .....	<b>117</b>

## Listado de Tablas

---

<i>Tabla 1-1.- Características morfométricas generales de adultos de Apodemus sylvaticus.* Longitud del cuerpo y la cabeza sin incluir la cola (Gosàlbez 1987)</i>	10
<i>Tabla 3-1.- Seguimiento de los residuos acumulados en el vertedero de Montferrer i Castellbó entre los años 1999 y 2003. El peso esta expresado en Toneladas.</i>	19
<i>Tabla 3-2.-Resumen de la climatología del área de estudio (Montferrer i Castellbó). Fuente: Atles Climàtic de Catalunya.</i>	20
<i>Tabla 3-3.- Seguimiento de los residuos acumulados en el vertedero de Can Mata entre los años 1999 y 2003. El peso esta expresado en Toneladas</i>	24
<i>Tabla 3-4.- Resumen de la climatología del área de estudio (Hostalets de Pierola). Fuente: Atles Climàtic de Catalunya.</i>	25
<i>Tabla 3-5.- Seguimiento de los residuos acumulados en el vertedero de Montferrer i Castellbó entre los años 1999 y 2003. El peso esta expresado en Toneladas.</i>	27
<i>Tabla 3-6.- Resumen de la climatología del área de estudio (Garraf). Fuente: Atles Climàtic de Catalunya</i>	28
<i>Tabla 3-7.- Resumen de la climatología del área de estudio (Collserola). Fuente: Atles Climàtic de Catalunya</i>	30
<i>Tabla 3-8.-Resumen de las capturas de Apodemus sylvaticus por localización</i>	37
<i>Tabla 3-9.-Resumen del esfuerzo de captura de Apodemus sylvaticus por localización</i>	38
<i>Tabla 3-10.- Resumen de pesos de los animales capturados</i>	38
<i>Tabla 3-11.-Resúmenes de casos de las medidas morfométricas de los individuos capturados</i>	38
<i>Tabla 3-12.-Resúmenes de casos de los pesos de los órganos de los individuos de cada localidad.</i>	39
<i>Tabla 3-13.- Resumen de la determinación de los hematocritos de las zonas de estudio</i>	40
<i>Tabla 3-14.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en el hígado</i>	46
<i>Tabla 3-15.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en el riñón</i>	46
<i>Tabla 3-16.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en la musculatura</i>	46
<i>Tabla 3-17.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en el hígado</i>	47
<i>Tabla 3-18.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en el riñón</i>	47
<i>Tabla 3-19.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en la musculatura</i>	47
<i>Tabla 3-20.- Resumen de casos de los Micronúcleos observados por cada 1000 eritrocitos.</i>	47
<i>Tabla 3-21 .-Resumen de casos del porcentaje de ADN en la cola de los linfocitos de los individuos estudiados</i>	48
<i>Tabla 3-22.- Resumen de las determinaciones de los parámetros de bioquímica sérica analizados</i>	48
<i>Tabla 3-23.- Resumen de casos de los pesos de los animales capturados distribuidos por sexo y localidad de captura.</i>	49
<i>Tabla 3-24.- Resumen de los pesos de los órganos de los animales estudiados distribuidos por la zona de captura.</i>	50

<i>Tabla 3-25.- Resumen de las longitudes registradas de los animales estudiados distribuidas por la zona de captura.</i>	50
<i>Tabla 3-26.- Resumen de los hematocritos de los animales estudiados distribuidas por la zona de captura.</i>	51
<i>Tabla 3-27.- Resumen de las medias de los eritrocitos, leucocitos y linfocitos de los animales estudiados distribuidos por la zona de captura.</i>	51
<i>Tabla 3-28 Resumen de las medias de los monocitos y granulocitos de los animales estudiados distribuidos por la zona de captura.</i>	51
<i>Tabla 3-29 Resumen de los porcentajes de ADN en la cola de los linfocitos circulantes</i>	54
<i>Tabla 3-30 Resumen de las determinaciones por bioquímica sérica.</i>	54
<i>Tabla 4-1.- Resumen de los animales capturados en la zona de estudio.</i>	71
<i>Tabla 4-2.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en el hígado</i>	71
<i>Tabla 4-3.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en el riñón</i>	72
<i>Tabla 4-4.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en el hígado</i>	72
<i>Tabla 4-5.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en el riñón</i>	73
<i>Tabla 4-6.- Resumen de casos de los Micronúcleos observados por cada 1000 eritrocitos.</i>	76
<i>Tabla 4-7.- Resumen de determinaciones séricas realizadas en las localidades de captura.</i>	76
<i>Tabla 5-1.- Caracterización del Dicromato potásico</i>	82
<i>Tabla 5-2.- Resumen de las propiedades fisicoquímicas del Dicromato potásico</i>	82
<i>Tabla 5-3.- Clasificación armonizada del Dicromato potásico según el Reglamento 1272/2008.</i>	84
<i>Tabla 5-4.- Caracterización del Tricloroetileno</i>	85
<i>Tabla 5-5.- Resumen de las propiedades fisicoquímicas del tricloroetileno</i>	86
<i>Tabla 5-6.- Clasificación armonizada del tricloroetileno según el Reglamento 1272/2008.</i>	86
<i>Tabla 5-7.- Resumen de los pesos de los animales y de sus órganos incluidos en el estudio</i>	91
<i>Tabla 5-8.- Resumen de los resultados obtenidos tras la determinación de la bioquímica sérica en el estudio con dicromato potásico</i>	92
<i>Tabla 5-9.- Resumen por especie de las diferencias de la determinación sérica entre el grupo tratamiento y el grupo control del estudio con exposición a dicromato potásico.</i>	93
<i>Tabla 5-10.- Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo del cometa en el estudio con dicromato potásico</i>	93
<i>Tabla 5-11.- Resumen de los pesos de los animales y de sus órganos incluidos en el estudio con administración de tricloroetileno.</i>	96
<i>Tabla 5-12.- Resumen de los resultados obtenidos tras la determinación de la bioquímica sérica en el estudio con administración de tricloroetileno.</i>	97
<i>Tabla 5-13.- Resumen por especie de las diferencias de la determinación sérica entre el grupo tratamiento y el grupo control del estudio con exposición a dicromato potásico.</i>	97
<i>Tabla 5-14.- Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo del cometa en el estudio con administración de tricloroetileno.</i>	98

## Listado de Figuras

---

<i>Figura 1-1.- Diagrama de la posible influencia del estrés fisiológico sobre los organismos y sobre el ecosistema.</i>	3
<i>Figura 1-2.- Taxonomía biológica del ratón de campo</i>	8
<i>Figura 3-1.-Esquema general de la estructura vertical de un vertedero.</i>	16
<i>Figura 3-2.-Relación de los vertidos de residuos municipales. (Kg/habitantes/año). Fuente Departament de Territori i Sostenibilitat. Agència de Residus de Catalunya.</i>	17
<i>Figura 3-3.- Imagen aérea del Deposito controlado de Montferrer i Castellbó. Detalle del vertedero, la balsa de lixiviado y la zona de captura de los animales de estudio (Fuente: Google earth)</i>	19
<i>Figura 3-4 Plano de la situación de los diferentes macro sectores del Deposito Controlado de Can Mata(Alba et al. 2006).</i>	22
<i>Figura 3-5.- Imagen aérea del vertedero de Can Mata. Detalle del vertedero, la balsa de lixiviado y la zona de captura de los animales de estudio (Fuente: Google earth)</i>	23
<i>Figura 3-6.- Fase de construcción de la ampliación del Vertedero de Can Mata, correspondiente a la Celda 1 (2002)</i>	23
<i>Figura 3-7.- Imagen aérea del Vertedero de Garraf. Detalle del vertedero, la balsa de lixiviado y la zona de captura de los animales de estudio (Fuente: Google earth)</i>	28
<i>Figura 3-8.- Imagen aérea de Collserola. Detalle de la zona de captura de los animales de estudio (Fuente: Google earth)</i>	31
<i>Figura 3-9.- Histograma de los índices de condición corporal de las zonas de estudio <math>\pm</math> desviación estándar (SD)</i>	39
- <i>Figura 3-10.- Histograma de la media de las patologías observadas por zona de estudio</i>	42
- <i>Figura 3-11.- Detalle de las patologías observadas en el bazo de <i>Apodemus sylvaticus</i>. A: Hemosiderosis; B: Megacariocitos; C: Starry Sky</i>	42
<i>Figura 3-12.- Detalles de las patologías observadas en los <i>Apodemus sylvaticus</i> capturados en la zona de Collserola. A: Engrosamiento de los septos; B: Congestión pulmonar; C: Pneumoconiosis; D: Tejido linfático peribronquial</i>	43
<i>Figura 3-13. Resumen de los valores medios de las patologías observados por cada punto de estudio.</i>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<i>Figura 3-14.- Detalle de las patologías observadas en los hígados de <i>Apodemus sylvaticus</i>. A: Apoptosis en hepatocitos; B: depósitos de lipofuscina en células de Kuffer; C: Necrosis hepática; D: Detalle de parásitos hallados en el hígado</i>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<i>Figura 3-16 Diagrama de cajas de los micronúcleos registrados por cada 1000 eritrocitos. * <math>p&lt;0,05</math></i>	53
<i>Figura 4-1.- Diagrama de cajas sobre el contenido de cromo total en el riñón.</i>	73
<i>Figura 4-2.- Histograma de la media de las patologías observadas por zona de estudio</i>	74

<i>Figura 4-3.- Detalle de las patologías observadas en los individuos capturados en la zona Llots nous. A: hemosiderosis; B: megacariocitos.</i>	75
<i>Figura 4-4.- Detalle de las patologías observadas en el riñón de Apodemus sylvaticus. A: Almacenamiento gutular hialino; B: Nefritis</i>	75
<i>Figura 5-1.- Histograma de la media de las patologías observada en el estudio con dicromato potásico</i>	94
<i>Figura 5-2.- Detalle de las patologías observadas en los animales tratados. A: Esteatosis microgutular en Mus musculus domesticus; B: Células de Ito en Apodemus sylvaticus.</i>	95
<i>Figura 5-3.- Histograma de la media de las patologías observada en el estudio con tricloroetileno</i>	99
<i>Figura 5-4.—Detalle de las patologías observadas en el hígado de los animales estudiados. A: Apoptosis en hepatocitos de Apodemus sylvaticus; B: Detalle de depósitos de Lipofuscina en células de Kuffer de Apodemus sylvaticus; C: Detalle de necrosis y regeneración en Mus musculus domesticus; D: Detalle de una célula apoptótica de Mus musculus domesticus</i>	100

## Listado de Abreviaturas

---

<b>Abreviación</b>	<b>Nombre</b>
SD	Desviación estándar
DC	Depósito Controlado
GOT	Transaminasa Glutámico-Oxalacética
AST	Aspartato transaminasa
GPT	Transaminasa Glutámico-Pirúvica
ALT	Alanina Aminotransferasa
Cr	Creatinina
BUN	Nitrógeno ureico en la sangre (Blood Urea Nitrogen)
UI	Unidades Internacionales
L	Litro
µg	microgramo
g	gramo
ng	nanogramo
mmol	mili mol
LCC	Longitud cabeza-cola
LC	Longitud de la cola
LP	Longitud de la extremidad posterior
LO	Longitud de la oreja
Cd	Cadmio
Pb	Plomo
Al	Aluminio
Mo	Molibdeno
Hg	Mercurio
Zn	Zinc
Cu	Cobre
Cr	Cromo
Co	Cobalto
Rb	Rubidio
Fe	Hierro
Ca	Calcio
Ba	Bario



## **Previo**

Antes de empezar con una introducción a la tesis en sí, encuentro necesario hacer una breve introducción histórica sobre los orígenes de esta tesis.

Corrían los años 70 cuando el Dr. Jacint Nadal, anticipándose a ciertos problemas que en un futuro se agravarían a nivel global, enfocó sus estudios hacía el campo de la contaminación ambiental y sus repercusiones a nivel poblacional. El grupo de Biología Animal-vertebrados, durante varias décadas, ha realizado diferentes enfoques del tema con numerosas tesis y artículos presentados en revistas nacionales e internacionales. Sin lugar a dudas, la colaboración del Dr. Miquel Borràs dio un enfoque toxicológico a los trabajos que se vieron reflejados en las tesis de Santiago Llacuna, Asumpta Gorriz, Eulalia Delgado, Rosa María Gómez y Jordi Peig, entre otras. Estos trabajos han sido realizados en zonas con una exposición crónica a fuentes de contaminación complejas y difusas, como el vertedero de Garraf, la central térmica de Cercs o zonas colindantes a la ciudad de México. En estos trabajos se realizaron estudios de campo directos y estudios de mesocosmos artificiales, trasladando ratones de laboratorio a las proximidades de una fuente de contaminación atmosférica, como es la central térmica de Cercs.

El presente trabajo es un grano de arena depositado sobre la montaña de labor de un conjunto de investigadores encabezados por el Dr. Nadal y el Dr. Borràs, entre otros, que pretende avanzar en el conocimiento de las fuentes de contaminación ambiental difusas y complejas, en el conocimiento y valorización de biomarcadores de efectos relevantes para el tipo de polución y conocer las respuestas de especies relativamente cercanas, en estudios en mesocosmos, tras la exposición a xenobióticos.



## 1 Introducción

La ecotoxicología es una ciencia multidisciplinar que engloba las ciencias físicas y las ciencias biológicas. Bajo esta visión englobadora, esta rama de la toxicología pretende alcanzar tres objetivos interrelacionados: el científico, el tecnológico y el práctico.

En el objetivo científico requiere la organización del conocimiento a través del análisis de múltiples hipótesis de trabajo, sobre exposición y efectos de los contaminantes en la biosfera.

Dentro del objetivo tecnológico, pretende desarrollar y aplicar herramientas y métodos para mejorar el conocimiento de exposiciones y efectos de los contaminantes, como métodos analíticos, los procedimientos de monitorización y el uso de biomarcadores junto con métodos estadísticos y tecnología de computación avanzada.

Finalmente, todo ello desemboca en un objetivo práctico que será la aplicación de dichos conocimientos disponibles para documentar y/o solucionar problemas específicos, como sería establecer de los límites regulatorios de los niveles de contaminantes en los diferentes compartimentos terrestres.

René Truhaut, debido a las necesidades del momento, definió, en 1975, la ecotoxicología, como la rama de la toxicología que concernía a los estudios tóxicos causados por contaminantes naturales o sintéticos, a los constituyentes de los ecosistemas (animales, plantas y microbios) en un contexto integrado (Truhaut 1977). Esta fue la primera vez que se habló de ecotoxicología y fue entonces cuando se empezó a desvincular de la existente doctrina de la toxicología Ambiental.

Años más tarde, en 1994, Los hermanos Forbes dieron la definición de lo que hoy en día se conoce como ecotoxicología: *campo de estudio donde se integran los efectos ecológicos y toxicológicos de los agentes contaminantes sobre los ecosistemas* (Forbes and Forbes 1994). Sin embargo, pese a su “reciente” aparición, los estudios ecotoxicológicos se han ido realizando desde hace siglos.

Por otro lado, la toxicología ambiental es el estudio multidisciplinario de los efectos de las sustancias y mezclas químicas, de origen humano o natural, en la salud humana y el medio ambiente. Esto incluye, por consiguiente, el estudio de los efectos de los productos químicos en los organismos, en sus entornos naturales y en los ecosistemas a los que pertenecen.

A diferencia de la Ecotoxicología, enfocada a comunidades y ecosistemas, la Toxicología Ambiental se centra en el estudio de los efectos de los contaminantes ambientales sobre los individuos. En sentido estricto, por tanto, podría aplicarse a cualquier especie; sin embargo,

de manera general se acepta reservar el término Toxicología Ambiental para designar el campo de la medicina, extraordinariamente pujante en los últimos años, que estudia las patologías producidas por la contaminación en los humanos, incluyendo también los estudios sobre la exposición.

En los últimos años ha surgido una corriente de pensamiento creciente que considera que sería muy ventajosa una integración, o colaboración, entre los enfoques de ambas disciplinas.

Existen muchas definiciones de contaminación, más o menos aceptadas, pero en un sentido amplio, podemos decir que se trata de la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos, en un medio donde de manera natural están ausentes o presentes en concentraciones de menor cuantía (Margalef 1998).

En un sentido amplio, esta definición encaja en la definición de xenobiótico. Los xenobióticos son sustancias químicas, encontradas en un organismo o en un compartimento terrestre, que no se producen en el propio organismo ni en el medio ambiente. Algunas sustancias químicas de origen natural (endobióticos) se consideran xenobióticos cuando están presentes en el medio ambiente en concentraciones superiores a las habituales.

Los xenobióticos son producidos principalmente por la actividad humana. Algunos organismos, sin embargo, pueden usarlos como parte de su sistema de defensa, por ejemplo, micotoxinas, toxinas bacterianas, etc. ... La exposición a los xenobióticos, actualmente, es inevitable, ya que son omnipresentes (Soucek 2011). Las sustancias y los preparados químicos se han hecho indispensables para la sociedad moderna, tanto en el ámbito de la producción de alimentos y fármacos como en las distintas ramas de procesamiento industrial de productos y servicios. Además, constituyen un factor importante en la prosperidad económica de un país y el bienestar social en términos de comercio y trabajo.

La producción mundial de sustancias y preparados ha pasado del millón de toneladas en 1930 a superar los 1.000 millones de toneladas en la actualidad. Hay, aproximadamente, unas 22.000 sustancias únicas registradas en la ECHA que forman parte de más de 95.000 dossiers. de las cuales 2400 se comercializan en cantidades superiores a las 1.000 toneladas por año.

La entrada de un xenobiótico en un ecosistema puede ocasionar perturbaciones relevantes. En la Figura 1-1, se detalla una visión particular de la entrada de contaminación a largo plazo en un ecosistema. Pese a que el diagrama se posiciona en una vertiente de pensamiento ecologista más que ecólogo, se concluye que la exposición de un organismo/comunidad a una mezcla de compuestos a largo plazo puede originar un cambio en la biodiversidad de la zona. Esta interpretación, sería un claro ejemplo de interpretación ecotoxicología de una

reacción del ecosistema ante un estímulo, donde se tienen en cuenta las relaciones intraespecíficas e interespecíficas con el ecosistema, así como la relación que tiene el ecosistema con las especies que en el habitan.

Cierto es, que los ecosistemas y sus habitantes se encargan de tamponar y metabolizar dichos niveles, sin embargo, el tiempo de asimilación del xenobiótico no se iguala, a veces, al tiempo de detoxificación del contaminante por parte del ecosistema. Este desfase entre estímulo y adaptación es lo que se denomina *stress*.

Algunos de los aspectos en los que se ha de incidir en la toxicología aplicada al medio ambiente son la implicación individual o colectiva que esta puede llegar a tener. Un ejemplo claro lo tenemos en la letalidad, punto de mira de la sociedad y de las entidades regulatorias que marcan el umbral del peligro.

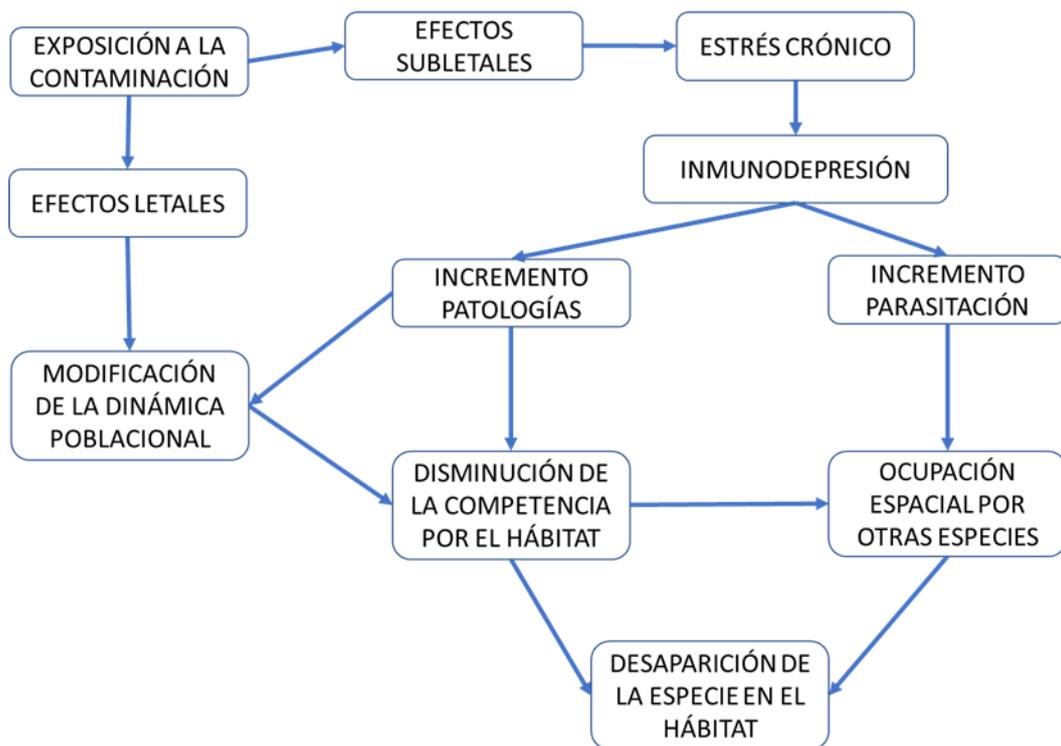


Figura 1-1.- Diagrama de la posible influencia del estrés fisiológico sobre los organismos y sobre el ecosistema.

La letalidad tras la exposición a una sustancia, o mezcla de sustancias, se puede entender como la máxima expresión de los efectos subletales, tras descartar la mortalidad azarosa. Por otra parte, los efectos subletales, se definen como aquellos efectos que dan lugar a alguna

alteración en el organismo o (comunidad) que no llegan a provocar la muerte de este. Algunos ejemplos de estos efectos son la reprotoxicidad (tanto la fertilidad y la fecundación, como la embriotoxicidad o la teratogenia), los cambios comportamentales (individuales, grupales o reproductivos), el desarrollo o crecimiento de los individuos, la genotoxicidad. Estos efectos pueden afectar al individuo, al conjunto de la población o a la interacción de esta con el ecosistema, alterando los patrones de equilibrio con el hábitat en periodos largos, sin presentar signos drásticos de letalidad.

El impacto de la actividad antropogénica sobre las comunidades naturales ha crecido exponencialmente en estrecha correlación con el incremento de la tecnología. En concreto, el extraordinario impulso experimentado por la industria química en la segunda mitad de siglo XX ha supuesto la introducción en el medio natural, por diversos conductos, de varios millares de nuevos compuestos cada año, un elevado porcentaje de los cuales presenta efectos biológicos significativos.

La presencia de xenobióticos biológicamente activos en el medio ambiente representa un grado de stress frecuentemente inaceptable para los organismos vivos, que se traduce a nivel de las poblaciones y de los ecosistemas. La actividad tóxica, bien sea directa o indirectamente, a través de la interferencia en el equilibrio de las comunidades naturales, puede llegar a suponer en determinadas circunstancias un riesgo significativo para las propias poblaciones humanas.

Es por ello que la evaluación del riesgo ecológico requiere una mayor profundización que la simple detección y cuantificación de los tóxicos ambientales por marcadores químicos.

Los organismos vivos, y muy en especial los vertebrados, por su capacidad de desplazamiento en el biotopo actúan como prospectores e integradores de información, tanto en el eje espacial como en el temporal. Es en este sentido que denominamos especies centinela a aquellas que por sus características (ubicuidad, frecuencia, sedentarismo, relativa longevidad, tolerancia suficiente a los xenobióticos, capacidad de bioacumulación) son capaces de proporcionar información sobre el grado de exposición a tóxicos y sobre los efectos biológicos de los mismos, actuando como señal de alarma temprana (Borràs and Nadal 2004).

Seleccionar un organismo centinela suele derivar en la asunción de ciertos compromisos. Una vez seleccionado el organismo, es posible, que no se encuentren efectos adversos relevantes por una exposición evidente. Este hecho no implica que los xenobióticos no estén presentes en el hábitat, sino que, debido a las características fisicoquímicas de los compuestos, a las interacciones entre poblaciones que ocupan los diferentes nichos ecológicos o por el propio ecosistema en sí, la especie centinela elegida está expuesta en menor medida a la fuente de

contaminación. Es entonces, cuando se debe valorar si el centinela puede proporcionar medidas cuantitativas del cambio provocado en el ambiente, para evaluar el alcance de la contaminación ambiental y sus implicaciones para la especie humana, emitiendo una alerta temprana (O'Brien, Kaneene, and Poppenga 1993).

El estudio y la comprensión holística del problema constituido por la introducción de xenobióticos en los ecosistemas, su distribución, tanto a nivel local como a escala regional o aún planetaria, su penetración en la biota, su metabolización y destino final en los organismos, la interacción con sus dianas celulares o moleculares y las repercusiones de sus efectos biológicos en el plano individual sobre los niveles superiores de relación, constituyen un objetivo que, considerándolo globalmente, sobrepasa las posibilidades de cualquier proyecto de investigación.

Por otro lado, el análisis de los compuestos químicos parentales, metabolitos, enzimas y otras sustancias relacionadas existentes y detectables en tejidos o fluidos corporales, ha sido usado para documentar la interacción de las sustancias con los sistemas biológicos. A dichas sustancias se les conoce con el nombre de biomarcadores. La cuantificación de los biomarcadores proporcionan evidencias suficientes que vinculan la exposición del organismo a una sustancia (o mezcla de sustancias). Esto incluye, cualquier medida o determinación que muestre una interacción entre un organismo y un agente ambiental.

En los estudios ambientales, la exposición a sustancias estresantes se evalúa básicamente mediante tres tipos de biomarcadores: Biomarcadores de exposición, que son aquellas sustancias xenobióticas, sus metabolitos, o el producto de la interacción entre xenobiótico y organismo, que son cuantificables en un tejido o compartimento; los Biomarcadores de efecto, que son las variaciones fisiológicas, las variaciones en patrones de conducta o las variaciones en el organismo que pueden asociarse a la alteración de la salud del organismo y los Biomarcadores de susceptibilidad que son los indicadores inherentes o las capacidades adquiridas de un organismo o grupo de individuos a responder ante la exposición a un xenobiótico específico.

Para abordar el estudio de sistemas interactivos tan complejos (como, de hecho, sucede en general en el campo de las ciencias biológicas) resulta indispensable el uso de modelos, inevitablemente simplificadores, que nos permitan una aproximación racional.

El uso de modelos, sin embargo, implica una relación dialéctica entre el realismo de los mismos y el control ejercido sobre los parámetros experimentales.

En efecto, los ensayos de laboratorio, realizados en individuos perfectamente caracterizados desde los puntos de vista biológico, sanitario y genético, y desarrollados en condiciones

estables determinadas por el experimentador, con frecuencia estudian los contaminantes de manera aislada, obviando las posibles interacciones y la modulación ejercida por los factores ambientales, utilizando cepas y aún especies significativamente distintas de las que habitan los ecosistemas objeto de estudio, y recurren a formas y pautas de exposición que poco tienen que ver con las que se dan en la naturaleza. Este tipo de estudios son los que con mayor frecuencia aparecen en la literatura científica, tanto por la oportunidad que ofrecen de extraer conclusiones de tipo mecanístico, como porque su mayor rapidez, sencillez y economía los hacen adecuados para propósitos de *screening*.

Por otra parte, los estudios de campo, de realización larga y laboriosa, proporcionan una mejor aproximación a la situación real, pero no permiten tomar en consideración factores como la variabilidad interindividual por razón de sexo, edad y genotipo, la posible limitación de la exposición mediante la reducción de la actividad y la permanencia en las madrigueras, la depredación selectiva de los individuos más afectados, o los eventuales efectos letales.

Existe también la posibilidad de acudir a soluciones intermedias, tales como la construcción de mesocosmos o el mantenimiento de animales de laboratorios enjaulados *in situ*. Sin embargo, la solución más relevante desde el punto de vista científico parece consistir en la utilización de diversos enfoques de partida, que permitan una aproximación a la realidad de la integración de los resultados obtenidos.

En este trabajo se propone al ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) como centinela de contaminación de fuentes complejas, es por ello que se ha realizado una introducción específica al organismo.

### **El ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*)**

El ratón de campo es una especie clasificada dentro de la familia de los múridos, del género *Apodemus* y descrita por *Linnaeus* en 1758. Se trata de un pequeño roedor con la cabeza proporcionalmente grande respecto al cuerpo, ojos negros y destacados, morro alargado, orejas prominentes, cola larga y fina y extremidades posteriores muy desarrolladas debido a su peculiar estilo de locomoción, a modo de pequeños saltos. La cola es larga (aproximadamente de la longitud del cuerpo y la cabeza) y fina.

El ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, es el micromamífero forestal más abundante de toda Catalunya. Se trata de una especie cosmopolita, presente en todo el continente europeo y en la mayoría de las islas, a excepción de las islas de Canarias y de las Azores. (Torre et al 2002) Sus hábitats favoritos se localizan en los bosques tanto caducifolios como esclerófilos. Es muy frecuente encontrarlo en la vegetación ruderal o en las zonas marginales de los bosques caducifolios, pinedas y encinares. Se suele acercar poco a las superficies urbanizadas, aunque dependiendo de la temperatura ambiental (sobre todo en invierno) y de la disposición de alimento es posible encontrarlo (Gosálbez 1987).

El ratón de campo fue descrito por primera vez en la localidad de Uppsala, Suecia en 1758 por Carl Nilsson, más comúnmente conocido por *Carolus Linnaeus*. Este ratón pertenece al orden de los roedores, familia *Muridae* y género *Apodemus* (Kaup, 1829) (Figura 1-2). El género *Apodemus* incluye a los ratones de campo del Viejo Mundo mientras que sus homólogos en el Nuevo Mundo están incluidos en el género *Peromyscus* (Torre et al 2002).

En la Península Ibérica habitan dos especies del género *Apodemus*: *Apodemus sylvaticus* y *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834). El ratón leonado, nombre común de *Apodemus flavicollis*, tiene una distribución más generalizada por el continente europeo, localizándose en la Península en áreas del tercio norte. Concretamente en Catalunya hay varias citas (Palomo and Gisbert 2002; Torre et al. 2009) en los Pirineos, las sierras litorales y en el Montseny. Los juveniles y sub-adultos son difíciles de diferenciar de los de *A. sylvaticus*, aunque los adultos, con un poco de experiencia, son más sencillos de diferenciar. Sin embargo, para estar completamente seguros hay que remitirse a pruebas bioquímicas y genéticas.

De la especie *Apodemus sylvaticus* se han descrito dos subespecies en la Península Ibérica: *Apodemus sylvaticus callipides*, descrita en el norte de la península y *Apodemus sylvaticus*

*dichruru*, de coloración más clara y menos voluminoso que ocupa el resto del territorio peninsular y parte de las islas Baleares. Otras dos subespecies son propias de las Islas Baleares: el *Apodemus sylvaticus eivissensis*, en la isla de Ibiza y el *Apodemus sylvaticus frumentariae*, en la isla de Formentera.

Status de la especie: no amenazada

Phylum *Chordata* (Batenson, 1885)  
Subphylum *Vertebrata*  
Infraphylum *Gnathostomata*  
Clase *Mammalia*  
Orden *Rodentia* (Griffith, 1827)  
Suborden *Sciurognathi* (Tullberg, 1899)  
Superfamilia *Muroidea* (Illiger, 1815)  
Familia *Muridae* (Illiger, 1815)  
Subfamilia *Murinae* (Illiger, 1815)  
Genero *Apodemus* (Kaup, 1829)  
Especie *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758)  
Subespecie *dichrurus* (Rafinesque, 1814)

Figura 1-2.- Taxonomía biológica del ratón de campo

En la zona del cuello y por la parte ventral, a menudo se puede localizar un triángulo de color beige, que nunca se llega a juntar con el color de los laterales.

Se trata de un ratón que no suele superar los 35 gramos de peso, con la cabeza proporcionalmente grande respecto al cuerpo, ojos negros y destacados, adaptados a la visión nocturna, morro alargado, pabellones auriculares prominentes, cola larga y fina, desprovista casi de pelos que se desprende del cuerpo con relativa facilidad, carácter adquirido evolutivamente para no ser depredado, y extremidades posteriores muy desarrolladas (superior a los 20 mm) debido a su peculiar estilo de locomoción, a modo de pequeños saltos. Debido a la longitud de las extremidades posteriores esta especie se diferencia inequívocamente de todas las especies del género *Mus*, en la que esta medida es inferior (Tabla 1-1).

Los adultos presentan la parte dorsal del cuerpo de color marrón rojizo (es por ello que, en algunas zonas, popularmente se les llame “ratón colorado”) mientras que la parte ventral es de color blanco o blanco-beige con una distinción clara entre ambas coloraciones. En la zona del cuello y por la parte ventral, a menudo se puede localizar un triángulo de color beige, que nunca se llega a juntar con el color de los laterales.

El ratón de campo, como todos los roedores silvestres, sufre varias mudas. La primera muda se produce cuando los animales pasan del estadio juvenil a sub adulto (entre el primer y segundo mes de vida) y la segunda cuando llega al estadio adulto. Los individuos juveniles

presentan un pelaje dorsal con tonalidad grisáceo que vira hacia un tono parduzco en la primera muda y hacia el marrón rojizo conforme van pasando las mudas hasta llegar a la coloración adulta. Por otro lado, la zona ventral permanece siempre blanca, amarilleando con la edad.

Apenas hay diferencias entre ambos sexos, aunque existe un ligero dimorfismo sexual en lo que respecta al tamaño, siendo los machos mayores que las hembras.

El cráneo es alargado y presenta arcos zigomáticos poco prominentes, ligeramente menos que *Apodemus flavicollis*. Con una región nasal estrecha. En total posee 16 dientes, sin caninos ni premolares, cuya fórmula dentaria responde a 1.0.0.3/1.0.0.3. Los incisivos son curvados y muy prominentes, siendo las piezas dentarias utilizadas para roer. Una característica típica de la especie son las marcas que dejan los incisivos superiores en los frutos secos de los que se alimenta, debido introduce únicamente los incisivos inferiores para romper la cáscara. Los molares son de crecimiento limitado, no renovables y con raíces utiliza para triturar el alimento. Con la edad, estos dientes sufren un desgaste que suele ser utilizado para diferenciar ejemplares jóvenes de adultos.

Este tema ha ocasionado cierta discusión, ya que si bien es cierto que el desgaste de los molares está relacionado con la edad del individuo no hay que descartar el régimen alimentario que éste dispone. Por otro lado, estas piezas dentarias, presentan alveolos que sirven para diferenciar claramente tanto géneros, como especies morfológicas muy similares. Un ejemplo clásico para diferenciar al género *Mus* del de *Apodemus* es que *Mus* presenta tres alvéolos en el molar 1 (M<sup>1</sup>) mientras que *Apodemus* presenta cuatro. En el caso de las diferencias entre *A. sylvaticus* y *A. flavicollis*, las diferencias radican en el desarrollo del tubérculo 9 del M<sup>2</sup>.

En la zona de Cataluña, presenta dos ciclos reproductores muy definidos: en los Pirineos, despunta la actividad reproductora hacia la primavera (abril) y puede durar hasta el otoño (octubre). Mientras que, en la zona mediterránea, la actividad sexual dura todo el año, disminuyendo en los meses de verano. (Gosàlbez 1987; Mendiola Goicoechea 2002). La gestación dura de 20 a 32 días, dependiendo si la hembra es primeriza y el parto suele coincidir con la media primavera y/o el otoño temprano.

En condiciones naturales la vida media de este ratón no suele sobrepasar el año y medio, debido principalmente a la carga de depredación que existe sobre él. En condiciones controladas se ha visto que pueden vivir más allá de los 3 años.

Es una especie especialmente nocturna, como máximos de actividad en el crepúsculo y el alba, especialmente este último (Gosàlbez 1987; Torre, Arrizabalaga, and Díaz 2002).

Tabla 1-1.- Características morfométricas generales de adultos de *Apodemus sylvaticus*. \* Longitud del cuerpo y la cabeza sin incluir la cola (Gosálbez 1987)

<b>Longitud</b>	<b>milímetros</b>
<b>Cuerpo *</b>	103-86
<b>Cola</b>	112-86
<b>Pabellones Auriculares</b>	20-16
<b>Planta extremidad anterior</b>	28-19
<b>Planta extremidad superior</b>	28-19

La presencia de *Apodemus sylvaticus* va acompañada de cierto recubrimiento vegetal (gramíneas, *Rubus sp.*, entre otras) Igual que otros múridos, presenta agorafobia, por lo que es difícil encontrarlo en áreas descubiertas. Se suele localizar en zonas marginales de bosques caducifolios, pinedas y encinares, también en setos y matorrales y muros de piedra, disminuyendo la densidad poblacional en cotas altas. Presenta baja densidad poblacional en maquias y garrigas, siendo difícil verlos en áreas muy xerófilas.

Su distribución por el bosque no es uniforme. Acostumbra a vivir en los márgenes de éste y sobre todo ligado a la presencia de pequeños cursos fluviales (Gosálbez 1987)

Debido a una jerarquía social, las hembras de *Apodemus sylvaticus*, en condiciones de cautividad, presentan una gran variedad en su ciclo estral (Brook and Clarke 2004). Jonsson y Silverin identificaron 3 tipos de patrones de ciclo estral entre las hembras de sus estudios: hembras de estro continuo, hembras con ciclo estral entre 6 y 11 días y hembras que raramente muestran signos de estro. (Jonsson and Silverin 1997).

En las especies gregarias la señalización activa y pasiva resulta muy importante para la comunicación entre los individuos de una misma comunidad o para la comunicación con otros organismos. En el ratón de campo los patrones experimentales de *allogrooming*, traducido como preparación social, son muy asimétricos, mientras los machos presentan altas frecuencias de *allogrooming* hacia las hembras, la frecuencia de las hembras hacia los machos es más baja (Stopka and Macdonald 1998, 1999).

Al inicio de la primavera, cuando la densidad poblacional es baja, el patrón de apareamiento es monógamo, mientras que, durante la época de reproducción, hasta noviembre, la promiscuidad o poligamia es el patrón normal. El hábitat del ratón de campo esta correlacionado con la disponibilidad del alimento. Debido a que las hembras tienen mayores requerimientos nutricionales durante la reproducción, las áreas de estas incrementan más que la de los machos, sin embargo, cuando la comida escasea, los machos permiten a las hembras entrar en sus territorios (Polechová and Stopka 2010).

Los patrones dinámicos de la población de *Apodemus sylvaticus* en condiciones donde hay alimento, y éste varía poco, son bajas, siendo las mayores distribuciones en periodos de ausencia reproductiva, aunque la presencia o no de alimento es la causa más importante de movimiento poblacional. La distribución de las poblaciones de *A. sylvaticus* varían considerablemente a lo largo del año y depende de la calidad de todo el hábitat (alimentación, cobertura vegetal, densidad de la población, tasa de hembras en la población, entre otras) (Montgomery and Montgomery 1990).

La reproducción de *A. sylvaticus* puede verse afectada por la temperatura, el fotoperiodo, el alimento, por factores genéticos y sociales y por densidad de la población (Clarke 1985; Montgomery 1980). Las hembras del ratón de campo que viven en hábitats con una fuente de recursos alta durante y tras la caída de las semillas de los árboles, prolongan la crianza o el periodo de cría en invierno, pero están sujetas a inhibiciones de la reproducción dependientes de la densidad lo que delimita el reclutamiento y el crecimiento poblacional durante la siguiente época de cría. Grandes fuentes de alimentos en invierno y primavera por lo tanto permiten a las hembras una reproducción temprana ventajosa. (Montgomery and Montgomery 1990). Por otro lado, las hembras nuevas, en época de actividad reproductiva, pueden ser inhibidas por las hembras residentes (Montgomery et al 1991)

La inhibición densodependiente espacial de la crianza de las hembras de *Apodemus sylvaticus* regula el incremento de la población durante la fase fértil del ciclo anual. Este mismo mecanismo puede ser eliminado por una superabundancia de comida en algunos años. (Montgomery et al 1991).



## 2 Objetivos

Considerando que el uso de centinelas de contaminación ambiental es esencial para una detección temprana de la contaminación ambiental y que su uso proporciona información sensible y fiable que nos permite gestionar el riesgo de una manera eficaz y responsable, es cada vez más necesario disponer de información sobre la caracterización rigurosa de especies ubicuas, que, a la larga, nos permita proporcionar mejores respuestas y establecer mejores gestiones ambientales.

Con esta premisa, el objetivo principal de la tesis es caracterizar y estudiar al ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, para responder a la pregunta de si es un buen modelo de estudio por exposición a fuentes de contaminación ambiental complejas.

Para dar respuesta a este objetivo, el trabajo se ha abordado desde dos puntos de vista. Un primer abordaje, basado en el estudio del ratón de campo capturado *in situ*, mediante biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto, con el fin de comprobar si este organismo puede incorporar información del entorno, independientemente de la fuente de emisión de la contaminación.

Para ello, se realizaron estudios

- en la zona de influencia de la balsa de lixiviados de Depósitos Controlados de residuos,
- a lo largo del torrente de drenaje de la balsa de lixiviados del Deposito Controlado de Garraf.
- y se caracterizó el suelo agrícola donde se habían vertido lodos de depuradora como fuente de materia orgánica en diferentes épocas.

Un segundo abordaje por el que se pretende entender si *Apodemus sylvaticus* responde de manera similar a los sistemas experimentales usados de manera habitual para evaluar el riesgo ambiental. Para ello se realizó un modelo de estudio en mesocosmos donde *Apodemus sylvaticus*, como roedor silvestre, y *Mus musculus domesticus* como modelo de laboratorio, fueron expuestos, por vía oral, a dos tipos de tóxicos conocidos, en concreto a un tóxico polar, dicromato potásico, y a un tóxico lipofílico, tricloroetileno.



### **3 *Apodemus sylvaticus* como centinela de fuentes de contaminación complejas: Depósitos Controlados de residuos sólidos**

#### **3.1 Introducción**

La población humana ha crecido de manera descontrolada en el último siglo. Las grandes urbanizaciones y la industrialización, el consumo y los estilos de vida de la sociedad actual generan una gran cantidad de residuos que actualmente distan de ser revalorizados. La gestión ambiental de dichos residuos ha derivado en la generación de gran cantidad de Depósitos de Residuos Controlados, también llamados Vertederos.

Los vertederos son emplazamientos cercados donde se depositan y/o eliminan los residuos de manera controlada. Estos pueden ser superficiales o subterráneos, dependiendo de la ubicación geológica. La forma administrativa de clasificarlos hace referencia al tipo de residuos que admiten:

- Vertederos para residuos peligrosos: aquellos que reciban residuos comprendidos en el ámbito de aplicación del apartado 4 del artículo 1 de la Directiva 91/689/CEE 1991 actualmente en vigor (Directiva 2008/98/CE 2008).
- Vertederos para residuos no peligrosos: aquellos que almacenan residuos con tratamiento previo que no experimentan ningún tipo de transformación (física, química o biológica)
- Vertederos para residuos inertes: aquellos que almacenan residuos sin tratamiento previo que no experimentan ningún tipo de transformación (física, química o biológica)

Los depósitos controlados de residuos suelen estar ubicados en lugares relativamente apartados de zonas urbanas, agrícolas y de las vías fluviales o masas de agua, adquiriendo relevancia ambiental, la interacción con las aguas subterráneas.

El diseño se realiza para evitar la contaminación del suelo, de las aguas superficiales y subterráneas y garantiza la recogida de los lixiviados generados por los residuos. Esto se consigue mediante la combinación de una barrera geológica y un revestimiento inferior artificial durante la vida del vertedero y una barrera geológica y un revestimiento superior artificial a partir de la clausura del mismo, dejando así totalmente aislados los residuos, sin posibilidad de interacción con el medio.

Los depósitos controlados de residuos, como emplazamiento humano en el medio ambiente, generan una inestabilidad en hábitat. La contaminación de los vertederos, más allá de la

propia presencia humana en cualquier medio natural, reside mayoritariamente en los lixiviados y los gases generados (Clément and Merlin 1995).

El lixiviado es el líquido que percola a través de los residuos depositados en un vertedero, bien sea emitido o esté contenido en los residuos. Se caracteriza por tener altas concentraciones de componentes orgánicos e inorgánicos. En términos de contaminación ambiental, la preocupación radica en la concentración de metales pesados o sustancias de alta preocupación (según el reglamento REACH (Reglamento (CE) No 1272/2008 2008): sustancias cancerígenas, mutagénicas, tóxicas para la reproducción o sustancias persistentes, bioacumulables y tóxicas o muy persistentes y muy bioacumulables) (Gupta and Rajamani 2015; Moody and Townsend 2017).

Los gases de un vertedero, generados a partir de los residuos almacenados, responden a una contaminación atmosférica tanto de tipo reductor como oxidante que sumadas a las características climáticas de nuestro país favorecen la reactividad fotoquímica y transformación de algunos contaminantes primarios en secundarios (Directiva 1999/31/CE 1999)

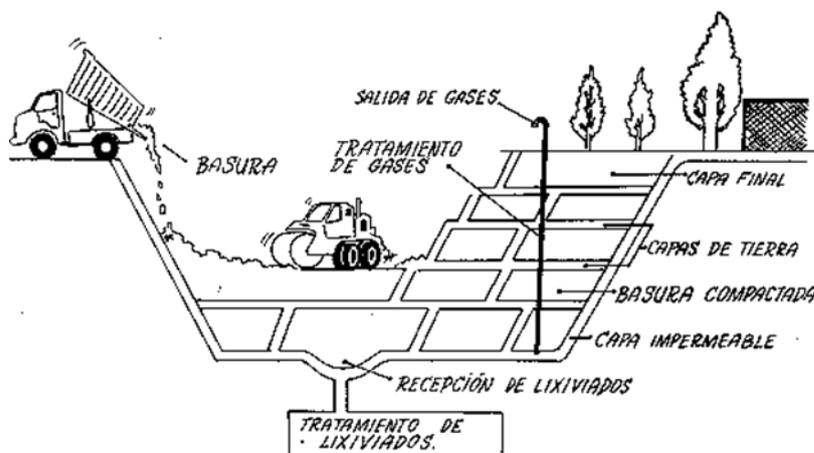


Figura 3-1.-Esquema general de la estructura vertical de un vertedero.

La generación de las cantidades actuales de residuos sólidos y su ubicación representa actualmente una preocupación para los gestores ambientales y para el medioambiente. En el año 2000, la generación global de residuos superó de largo los 12 billones de toneladas y se prevé que se alcancen los 19 billones de toneladas en 2025 (Mishra et al. 2017). En Europa, en cifras globales, estas cifras superan los 2000 millones de toneladas por año (EUROSTAT 2019).

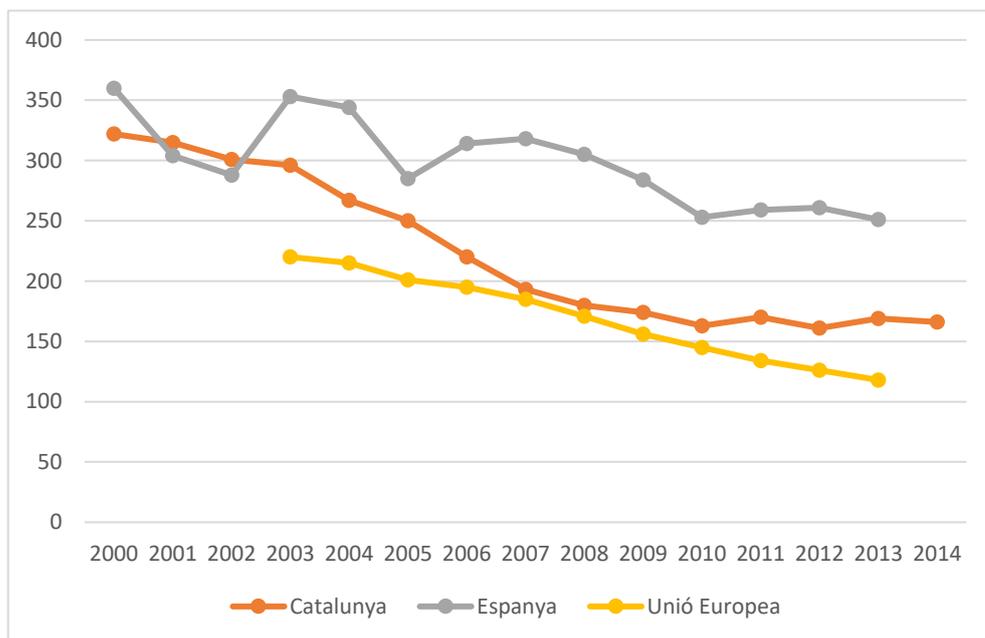


Figura 3-2.-Relación de los vertidos de residuos municipales. (Kg/habitantes/año). Fuente Departament de Territori i Sostenibilitat. Agència de Residus de Catalunya.

En el Instituto Nacional de Estadística el número de vertederos reconocidos data de 1998 y se resumen en 195. Igualmente, se dan cifras que oscilan entre 50.000 y 90.000 micro-vertederos en los que se vierte absolutamente de todo, desde residuos municipales hasta residuos tóxicos y peligrosos, inertes, voluminosos, etc.

Según el Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya, en el año 2003 en Catalunya, existían 28 depósitos controlados de residuos sólidos municipales.

La situación de los vertederos en España es ciertamente problemática. En el año 2003, España fue advertida por la Comisión Europea al encabezar la lista de países con mayor número de vertederos ilegales (EC 2003).

Los vertederos son la forma más antigua, más extensamente usada y la más barata de gestionar los residuos. Con el tiempo, el agua de la lluvia percola y alcanza estos residuos, disolviendo y arrastrando sustancias orgánicas e inorgánicas en forma de lixiviados. Estos lixiviados pueden alcanzar el suelo, las aguas freáticas y las aguas superficiales generando una contaminación ambiental difusa que puede derivar en riesgos para la salud humana y ambiental.

### **Zonas de estudio**

Las zonas escogidas para el estudio fueron:

- Depósito controlado de Montferrer i Castellbó
- Depósito controlado de Hostalets de Pierola
- Depósito controlado de Garraf

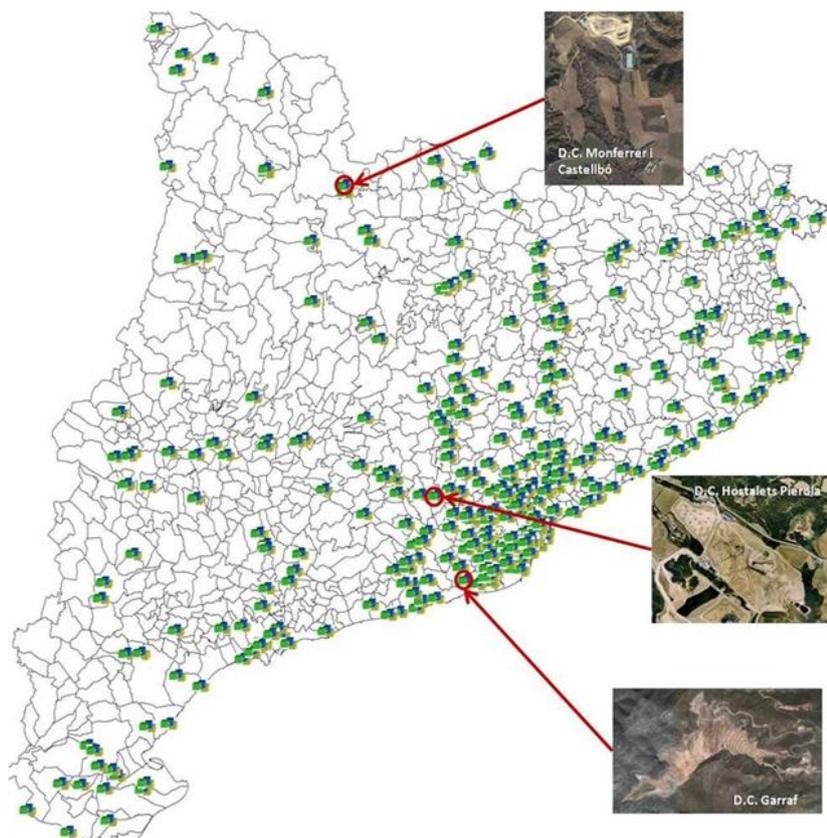


Figura 3-3.- Mapa de distribución de los depósitos controlados de recogida de residuos sólidos urbanos en Catalunya. Marcados los Vertederos seleccionados para el estudio (Fuente: Departament de Medi ambient i habitatge; Generalitat Catalunya y Google earth).

### **Depósito Controlado de Montferrer i Castellbó**

El depósito controlado de Montferrer i Castellbó (DC de Bellestar), Código del gestor industrial: E-108.95, está situado en el municipio de Montferrer i Castellbó, concretamente en las coordenadas X, Y: 371113.0, 4692330.0, casi en la frontera municipal con La Seu d'Urgell. Se trata de un vertedero comarcal, cuyos inicios se remontan a 1985 y que actualmente tiene titularidad pública y está administrado por la Mancomunitat de recollida d'escombraries de l'Urgellet (Figura 3-3).

Este depósito es de ámbito supramunicipal y almacena residuos municipales no peligrosos de los domicilios de la ciudad de la Seu d'Urgell, así como de los municipios colindantes. En la Tabla 3-1 se pueden observar los porcentajes de los residuos vertidos en el vertedero entre los años 1999 y 2003.

Tabla 3-1.- Seguimiento de los residuos acumulados en el vertedero de Montferrer i Castellbó entre los años 1999 y 2003. El peso esta expresado en Toneladas.

Nombre de la planta	1999	2000	2001	2002	2003
D.C. DE MONTFERRER I CASTELLBÒ	5.451,00	4.766,40	4.284,20	5.794,21	5.867,72
% (respecto al total de Catalunya)	0,24	0,21	0,19	0,25	0,26

#### Clima del área

Siguiendo la clasificación climática propuesta por Thornthwaite, basada en la evapotranspiración potencial como parámetro fundamental para la delimitación de los distintos tipos climáticos y seguida por el Institut Cartogràfic de Catalunya y el Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya, la zona de estudio presenta un clima de tipo mediterráneo, típico de las zonas húmedas de alta montaña. El clima mediterráneo subhúmedo es un clima donde la amplitud térmica es algo más elevada que en la costa, donde los veranos son frescos y los inviernos suelen ser bastante fríos. Esto provoca que en invierno las precipitaciones suelen caer en forma de nieve.



Figura 3-3.- Imagen aérea del Depósito controlado de Montferrer i Castellbó. Detalle del vertedero, la balsa de lixivado y la zona de captura de los animales de estudio (Fuente: Google earth)

El clima de alta montaña que hay en la zona de estudio se caracteriza por la proximidad a las montañas de los Pirineos, lo que condiciona el régimen pluviométrico incrementando el número de precipitaciones en verano>primavera>otoño>invierno. La amplitud térmica es ligeramente más elevada que en el vertedero de Can Mata (17-18°C), Apenas hay déficit hídrico anual, consecuencia de la nebulosidad de la zona, lo que impide una mayor radiación solar media anual (Tabla 3-2).

Tabla 3-2.-Resumen de la climatología del área de estudio (Montferrer i Castellbó). Fuente: *Atlas Climàtic de Catalunya*.

<b>Temperatura media anual</b>	10-11 °C
<b>Temperatura media del mes de enero</b>	2-3 °C
<b>Temperatura media del mes de julio</b>	19-20 °C
<b>Amplitud térmica anual</b>	17-18 °C
<b>Precipitación media anual</b>	< 650 mm
<b>Régimen pluviométrico estacional</b>	VPOI
<b>Déficit hídrico anual (según Thornthwaite)</b>	0-100 mm.
<b>Evapotranspiración potencial</b>	572 a 712 Mesotérmica I (B'1)
<b>Eficacia térmica (verano)</b>	51.9 a 56.3% (b'3)
<b>Tipo de clima, según el índice de humedad de Thornthwaite</b>	0 a 20 Subhúmedo (C <sub>2</sub> )
<b>Irradiación media anual (MJ/m<sup>2</sup>)</b>	13.5 a 14
<b>Viento medio anual (60 m)</b>	19.8 Km/h

### El hábitat

En el municipio podemos encontrar el encinar de montaña (*Quercetum mediterraneo-montanum*) con bosques de encinas no muy densos (*Quercus ilex*) y otros portes caducifolios. También podemos encontrar especies más termófilas, aunque de manera menos abundante. Junto a los encinares aparece el pino rojo (*Pinus sylvestris*), durillo o laurel salvaje (*Viburnum tinus*) y la olivardilla (*Phillyrea media*). Lo más característico es la existencia de un estrato herbáceo rico, que recubre la mayor parte del suelo. Encontramos entre otros el fenazo de bosque (*Brachypodium sylvaticum*), la violeta de bosque (*Viola sylvestris*), la fresa (*Fragaria vesca*). No hay que olvidar las masas de pequeños abedules (*Betula pendula*), que son muy abundantes por el Pirineo. Son comunidades secundarias que en los procesos de sucesión ocupan los aclarados del bosque, por ejemplo, después de una tala. Tal y como pasa con los pinos en tierras más bajas, los abedules son árboles sufridos, capaces de colonizar vertientes con poca tierra.

Concretamente la zona de muestreo fue el torrente de drenaje del vertedero, donde además de la vegetación anteriormente comentada, no faltaban las zarzas (*Rubus ulmifolius*) distribuidas entre las áreas de cultivo lindantes.

La zona del vertedero de Montferrer i Castellbó no está incluida dentro del *Pla d'Espais d'Interès Natural* (PEIN) de la Generalitat de Catalunya, aunque dentro del municipio de Montferrer i Castellbó, a unos 8 km dirección norte, nos encontramos con el PEIN del Alt Pirineu. (Decret 194/2003) Este espacio también está incluido dentro de los territorios de la Red Natura 2000 y está clasificado como Zona de especial protección para las aves (ZEPA). No mucho más al sur, a poco más de 5 km, nos encontramos con otra zona catalogada como PEIN: el Parque Natural de La Serra del Cadí- el Moixeró (DECRET 353/1983 1983).

Por otro lado, el espacio donde está ubicado el depósito controlado está incluido dentro de la superficie del Plan de recuperación del quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*), especie con poco más de 50 parejas reproductoras y catalogada como especie de especial protección y en peligro de extinción.

Según la Directiva de hábitats de la Comunidad Europea (Directiva 97/62/CEE 1997), el depósito controlado de Montferrer i Castellbó se encuentra, a escasos 400 metros, rodeado al noreste y al oeste por un hábitat de interés comunitario de carácter no prioritario. Esta zona protegida está recubierta de encinas y carrasca (Código 9340) con un considerable estado de conservación. Lindando por el sur, está situada a escasos metros de otro hábitat protegido, también con carácter no prioritario, debido a su buen estado. Este hábitat está compuesto por prados de cultivo de tierras bajas y de montaña media que, aunque frecuentado por humanos, es utilizado por numerosas especies como territorio de vida y reproducción (Código 6510).

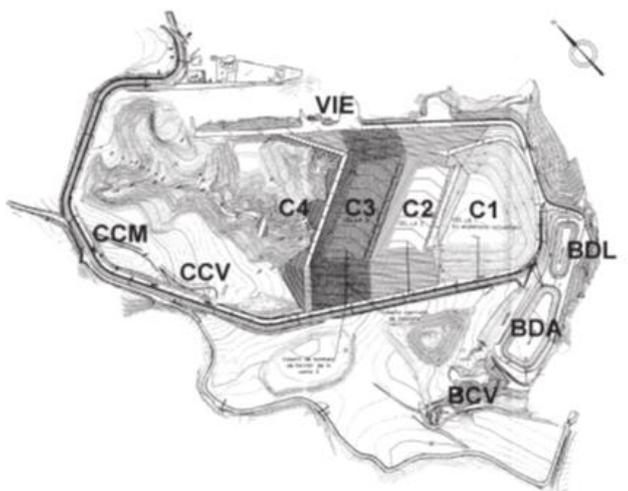
La zona de estudio presenta un hábitat muy favorable para la fauna y flora, y el hecho de tener las medidas de protección antes mencionadas, hace de la zona un buen corredor ecológico entre los diferentes espacios naturales.

Los animales se capturaron durante el segundo semestre del año 2001 en el torrente de desagüe de la balsa de lixiviados del DC de Bellestar (La Seu d'Urgell), que recoge los residuos de origen doméstico, rural e industrial procedentes de la Comarca de l'Alt Urgell, con una población cercana a los 19.000 habitantes.

### **El Depósito Controlado de Can Mata**

El depósito controlado de Hostalets de Pierola, de ahora en adelante Vertedero de Can Mata, Código del gestor industrial: E-32.90, está situado en el municipio de Hostalets de Pierola, concretamente en las coordenadas X, Y: 400821.0, 4598170.0 (Figura 3-5). Presenta un único punto de acceso situado en el kilómetro 8,5 de la carretera CB-231 de Esparraguera a Piera. Se trata de un vertedero que data de 1990 y del que actualmente tiene titularidad la empresa Gestió, Tractament i Recuperació, S.A. (G.T.R). Está considerado un vertedero de residuos sólidos industriales (inertes y no especiales) así como de origen municipal con un buen tratamiento de los residuos.

El Depósito Controlado de Can Mata empezó a funcionar de manera clandestina a principios de los setenta. Más tarde y sin ser auditado, el ayuntamiento de Hostalets de Pierola lo legalizó al concederle con fecha de 5 de Octubre de 1985 la licencia de actividades clasificadas para residuos sólidos urbanos, excluyendo expresamente los residuos tóxicos y peligrosos según la Directiva 78/319 (Directiva 78/319/CEE 1978). El 26 de febrero de 1988 el Ayuntamiento de Hostalets de Pierola ordenó la clausura por multitud de incumplimientos de las condiciones de la licencia y por la normativa ambiental aplicable. Uno de los problemas que tenía es que la balsa de lixiviados se desbordaba cuando llovía, Posteriormente, el 26 de octubre de 1989 se levantó el cierre del vertedero bajo la autorización municipal y la Junta de Residus del Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya (BUTLLETÍ OFICIAL DEL PARLAMENT DE CATALUNYA 1999).



*Figura 3-4 Plano de la situación de los diferentes macro sectores del Deposito Controlado de Can Mata(Alba et al. 2006).*



Figura 3-5.- Imagen aérea del vertedero de Can Mata. Detalle del vertedero, la balsa de lixiviado y la zona de captura de los animales de estudio (Fuente: Google earth)



Figura 3-6.- Fase de construcción de la ampliación del Vertedero de Can Mata, correspondiente a la Celda 1 (2002)

Entre los años 2001-2002, fecha en la que se capturaron los ratones y se realizó el estudio, el Depósito Controlado de Can Mata disponía de una báscula de plataforma electrónica: una plataforma metálica elevada para inspeccionar la carga y para facilitar la toma de muestra, las oficinas de recepción y un anexo donde se localizaba el laboratorio. Durante esa época el

depósito se encontraba en plena transformación por ampliación y mejoras de las instalaciones (Figura 3-5; Figura 3-6)

La balsa de lixiviados está impermeabilizada con una lámina de polietileno de alta densidad de 2 mm de grueso y de 2700 m<sup>3</sup> de capacidad. Era desde aquí, a través de una instalación de bombeo, desde donde se cargaban diariamente los camiones con el lixiviado para su posterior tratamiento en la estación depuradora de agua industriales.

La balsa de decantación de aguas pluviales de 8000 m<sup>3</sup>, construida siguiendo el curso descendiente, recoge las aguas de la lluvia que caen sobre la superficie del vertido en la explotación cubierta por tierras. Esta balsa ayuda a detectar posibles contaminaciones producidas por deficiencias en la explotación, así como el afloramiento de los lixiviados antes de ser vertidos al medio natural (Figura 3-4).

Tabla 3-3.- Seguimiento de los residuos acumulados en el vertedero de Can Mata entre los años 1999 y 2003. El peso esta expresado en Toneladas

Nombre de la planta	1999	2000	2001	2002	2003
<b>D.C. DE HOSTALETS DE PIEROLA</b>	238.597,60	230.780,50	244.538,70	240.190,30	235.363,10
<b>Porcentaje respecto a Catalunya</b>	10,49	10,14	10,91	10,21	10,50

Los residuos admitidos en el Depósito Controlado de Can Mata son residuos urbanos, provenientes directamente de la recogida domiciliaria o bien de la estación de transferencia o residuos industriales inertes y asimilables a los urbanos. Una vez los residuos llegan al depósito son compactados de inmediato, mediante un compactador de pata de cabra y recubiertos por una capa de tierra. Este tipo de técnica facilita la fermentación de tipo anaeróbico de los residuos y dificulta la proliferación de roedores e insectos, así como reduce el riesgo de incendio.

Debido a esta compactación, la presencia de oxígeno en los residuos es mínima. Esta ausencia hace que la degradación de la materia orgánica sea mucho más lenta que en condiciones aeróbicas. Esta transformación genera inicialmente ácidos orgánicos (origen del característico mal olor de los vertederos), y gas carbónico y metano en una segunda fase. También se produce gas amónico, que debido a la presencia de agua se disuelve inmediatamente en el agua residual de los vertidos.

El gas que se desprende está compuesto en un 50-60 % por metano y el porcentaje restante por gases carbónicos. El metano es un gas más ligero que el aire, y, por tanto, con tendencia a ser expelido de la masa del vertido. A medida que aumenta su producción se crea una ligera sobrepresión que obliga al gas a migrar, tanto hacia las paredes más altas como hacia el

fondo o hacia los límites laterales de la Celda. Debido a este proceso surgió la necesidad de instalar chimeneas para la extracción y recolección de gases.

A diferencia de otras explotaciones similares visitadas, este vertedero mantenía bien controlada la población de roedores y de insectos mediante la compactación mencionada anteriormente, el tratamiento contra roedores todo el año y el uso de insecticidas selectivos y variados para evitar que se habituaran al mismo.

### Clima del área

El clima tiene una incidencia directa sobre el agua, el medio físico y el natural, razón por la cual resulta de interés para el estudio del medio en conjunto. Es un factor que determina la geomorfología, la tipología del suelo, los tipos de forma vegetal, la hidrología, el potencial faunístico y condiciona las formas de vida y los usos del suelo por parte del hombre.

Las series temporales de los datos meteorológicos permiten caracterizar el clima. Actualmente podemos conocer el clima de cualquier punto de Catalunya gracias al trabajo de extrapolación realizado por el Institut Cartogràfic de Catalunya y el Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya, que ha dado como resultado el Atlas Climático de Catalunya (Tabla 3-4).

Tabla 3-4.- Resumen de la climatología del área de estudio (Hostalets de Pierola). Fuente: Atlas Climàtic de Catalunya.

<b>Temperatura media anual</b>	14-15 °C
<b>Temperatura media del mes de enero</b>	6-7 °C
<b>Temperatura media del mes de julio</b>	23-24 °C
<b>Amplitud térmica anual</b>	16-17 °C
<b>Precipitación media anual</b>	600 mm
<b>Régimen pluviométrico estacional</b>	OPIV
<b>Déficit hídrico anual (según Thornthwaite)</b>	100-200 mm.
<b>Evapotranspiración potencial</b>	712 a 855 mm Mesotérmica II (B'2)
<b>Eficacia térmica (verano)</b>	48 a 51% (b'4)
<b>Tipo de clima, según el índice de humedad de Thornthwaite</b>	-20 a 0 Seco Subhúmedo (C <sub>1</sub> )
<b>Irradiación media anual (MJ/m<sup>2</sup>)</b>	14.5 a 15
<b>Viento medio anual (60 m)</b>	19.8 Km/h

La zona de estudio presenta un clima de tipo mediterráneo. El clima mediterráneo es un clima donde las temperaturas no son excesivamente extremas, los inviernos bastante suaves y los veranos son largos y con temperaturas elevadas. Pero seguramente la particularidad más notable de este clima es la coexistencia de un periodo caluroso y a la vez seco (asociado al estado anticiclónico subtropical que impera en la zona durante el verano). Por otro lado, cabe

destacar la variabilidad interanual del clima mediterráneo, más en estos tiempos, con notables variaciones de la temperatura y la precipitación de un año al otro.

El clima mediterráneo que hay en la zona de estudio se caracteriza por la proximidad a la Serralada Prelitoral, aunque su cercanía a la Serralada Litoral y la poca altura de ésta condiciona el régimen pluviométrico incrementando el número de precipitaciones en otoño>primavera>invierno>verano, es por ello por lo que, aun estando alejado del mar, sigue patrones similares al clima costero catalán, con un mínimo estival. La relativa cercanía al mar hace que la amplitud térmica oscile entre 16 y los 17°C. Las altas temperaturas en verano junto con las bajas precipitaciones hacen que la evapotranspiración sea elevada, estableciendo a esta zona dentro de la zona Mesotérmica II. Al compararlo con el régimen de lluvias anual conlleva a clasificar la zona dentro de un clima seco subhúmedo.

### **El hábitat**

El municipio de Hostalets de Pierola se encuentra dentro de la región biogeográfica mediterránea. La vegetación es por tanto claramente mediterránea. Como el resto de la Serralada Prelitoral, el bosque de encinas (*Quercus ilex*) sería la vegetación natural, aunque la acción del hombre y su transformación, tanto directa como indirecta del medio, han provocado que proliferen los bosques de pino blanco (*Pinus halepensis*), con portes sueltos de pino silvestre (*Pinus sylvestris*) y encinas sin que, de momento, estos últimos sean las masas forestales predominantes.

El coscojar (*Quercetum cocciferae*), es una comunidad secundaria que procede de la degradación del carrascar (*Quercetum rotundifoliae*). Se trata del sotobosque de la zona de estudio: una formación arbustiva de porte bajo y que en algunas zonas se hacía intransitable. Como especies más abundantes se encontraban la coscoja (*Quercus coccifera*), el cerberillo (*Brachypodium retussum*), el romero (*Rosmarinus officinalis*), la bruguera (*Erica multiflora*) y la estepa (*Cistus sp.*).

La zona del vertedero de Can Mata no está incluida dentro del Pla d'Espais d'Interès Natural (PEIN) de la Generalitat de Catalunya, aunque dentro del municipio de Hostalets de Pierola, a unos 5 km dirección norte, nos encontramos con el PEIN de Les Roques Blanques de 571 ha.

Según la Directiva de hábitats de la Comunidad Europea (97/62/CE), el depósito controlado de Can Mata se encuentra rodeado por un hábitat de interés comunitario de carácter no prioritario a escasos 100 metros. Esta zona protegida está compuesta por pinares mediterráneos (Código 9540) con un buen estado de conservación.

La zona de estudio es un hábitat natural modificado por el hombre, aunque en cierta manera, debido a la cercanía de los pinares y los campos de cultivos que hay en los alrededores cobija a numerosas especies y abundante fauna mediterránea.

Las capturas se realizaron durante la primavera de 2001 en la riera seca de desagüe de la balsa de lixiviados en el Vertedero de Can Mata (Hostalets de Pierola, Anoia) que recoge residuos de origen doméstico a nivel comarcal y que consta de una población de 87.000 habitantes.

### **El Depósito Controlado de Garraf**

El Depósito Controlado de Garraf (DC de Garraf) o Vertedero de Garraf, es un depósito ubicado en el municipio de Gavá, concretamente en las coordenadas X, Y: 410174.00, 4572546.00; Lon, Lat: 1°55'37.6801", 41°17'55.1382".0 (Figura 3-7), en la zona conocida como la Vall d'en Joan. Con titularidad pública a favor de la entidad Metropolitana de Servicios Hidráulicos y tratamiento de aguas. Se trata de un vertedero de ámbito supra comarcal con residuos de tipo municipal, que fue inaugurado oficialmente en 1974 pero que previamente había sido un vertedero incontrolado. La cantidad de residuos recogidos y acumulados en los años de estudio por este depósito, se recogen en la Tabla 3-5. Su código de gestor industrial es E-22.89

*Tabla 3-5.- Seguimiento de los residuos acumulados en el vertedero de Montferrer i Castellbó entre los años 1999 y 2003. El peso esta expresado en Toneladas.*

<b>Nombre de la planta</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>
<b>D.C: DEL GARRAF</b>	919.082,90	849.956,00	791.170,30	858.183,10	675.882,80
<b>% (respecto al total de Catalunya)</b>	40,42%	37,35%	35,31%	36,47%	30,14%

### **Clima del área**

Comentado anteriormente, el clima mediterráneo es un clima donde las temperaturas no varían excesivamente durante las estaciones anuales.

En este caso en particular, la cercanía al mar condiciona notablemente el microclima de la zona. La constante acción de los vientos, así como los largos periodos de sequedad interanual, favorecen la implantación de algunas especies vegetales en detrimento de otras.

La zona está condicionada por un régimen pluviométrico típico de las zonas mediterráneas ubicadas en la zona Prelitoral, con un mayor volumen de agua caída en los meses de otoño y primavera, mientras que en invierno y verano serían los meses menos mojados. La cercanía al mar y su ubicación hacen que la temperatura sea, de media, ligeramente inferior a la zona del vertedero de Can Mata, entre 16 y 17°C (Tabla 3-6).



Figura 3-7.- Imagen aérea del Vertedero de Garraf. Detalle del vertedero, la balsa de lixiviado y la zona de captura de los animales de estudio (Fuente: Google earth)

### El hábitat

El Macizo del Garraf está integrado dentro de los perímetros de protección prioritaria (PPP) con un perímetro de 71,7 Km y un área de 17408 ha. Es una zona predominantemente calcárea con alguna excepción por afloramiento de material silíceo.

Tabla 3-6.- Resumen de la climatología del área de estudio (Garraf). Fuente: Atlas Climàtic de Catalunya

<b>Temperatura media anual</b>	14-15 °C
<b>Temperatura media del mes de enero</b>	10-11 °C
<b>Temperatura media del mes de julio</b>	23-24 °C
<b>Amplitud térmica anual</b>	15 a 16 °C
<b>Precipitación media anual</b>	600 a 650 mm
<b>Régimen pluviométrico estacional</b>	TPHE
<b>Déficit hídrico anual (según Thornthwaite)</b>	100-200 mm.
<b>Evapotranspiración potencial</b>	712 a 855 mm
<b>Eficacia térmica (verano)</b>	Mesotérmica II (B'2)
<b>Tipo de clima, según el índice de humedad de Thornthwaite</b>	48 % a 51,9 % (b'4)
<b>Irradiación media anual (MJ/m<sup>2</sup>)</b>	-20 a 0 Seco subhúmedo (C <sub>1</sub> )
<b>Viento medio anual (60 m)</b>	16 a 16.5
	< 19.8 Km/h

El relieve ha sido esculpido a lo largo de los años por factores de erosión normal y por factores de erosión kárstica que finalmente ha otorgado a la zona un cromatismo y un relieve singular.

Por otro lado, el paso de la autopista del Garraf provoca fragmentación sustancial del terreno y su morfología paisajística, así como de los sistemas naturales del sector litoral.

El Garraf es un espacio con inicio en el litoral y que se adentra en un macizo que costea el litoral. Con una elevada riqueza de hábitats y biodiversidad, alberga comunidades típicamente mediterráneas como el coscojo (*Quercus coccifera*) o el palmito (*Chamaerops humilis*), pasando por zonas con dominio de pino blanco (*Pinus halepensis*) o pequeños núcleos de encinas, en las hondonadas y zonas húmedas.

El estrés hídrico típico de los climas mediterráneos, con aridez e insolación en algunos periodos, no favorecen la afloración de una fauna exuberante, si no que favorece a especies adaptadas a estas condiciones. En paseos por la zona no es difícil avistar halcones peregrinos (*Falco peregrinus*), serpientes de herradura (*Hemorrhois hippocrepis*) entre otras.

La zona de estudio se situa en un bosque público de 1303 ha, inmersa el Macizo de Garraf, territorio clasificado dentro del Pla d'Espais d'Interés Natural, desde 2008, con una superficie de 14810 ha. Cuenta también con un hábitat d'interés Comunitario en Cataluña caracterizado por la presencia de costeros rocosos con vegetación rupícola.

El vertedero de Garraf tiene una mención especial en el capítulo 1 ya que se realizó una investigación en profundidad. Por un lado, los animales capturados en las áreas de influencia de la balsa de lixiviados se compararon con las capturas en los otros depósitos controlados y, por otro lado, se hizo un estudio de la influencia del vertedero a lo largo del torrente de drenaje ubicado tras a balsa de lixiviados. Las capturas se realizaron durante la primavera tardía y el invierno de 2004, en 3 áreas de influencia del vertedero: VG, junto a la balsa de lixiviados, punto donde se recogen los lixiviados de las diferentes celdas del vertedero y dos puntos siguiendo el curso del torrente de drenaje, que discurre por debajo de la balsa, a 2 y 4 kilómetros, VG2 y VG4, respectivamente. Como zona control se usó un punto en un valle paralelo, situado fuera del área de influencia del vertedero, de características geológicas similares y sin fuentes de contaminación conocidas (CVG).

Como zona de referencia del estudio particular del vertedero de Garraf se usó una localidad cercana a la localidad de Abrera. Las características físicas del terreno y la climatología son similares a la zona de estudio. Se pretendió que la diferencia existente entre las variables de la zona de referencia y las áreas de estudio del vertedero de Garraf fueran únicamente la influencia del propio vertedero y la distancia al mismo.

### **Zona de Referencia: Collserola**

La zona control se ubicó en la zona alta de la Sierra de Collserola. Esta ubicación en un parque periurbano, con núcleos urbanos cercanos, relativa cercanía a zonas habitadas pretende mostrar la contaminación basal y difusa existente en todas las zonas de estudio.

Como las otras zonas, se trata de un área de plena influencia mediterránea con inviernos suaves y veranos calurosos y secos. Las precipitaciones siguen un régimen pluviométrico inter-estacional, es decir, lluvias predominantes en otoño y primavera, mientras que las estaciones de invierno y verano presentan precipitaciones menores.

Sin duda, la riqueza de hábitat de la sierra de Collserola es una de las características más destacables de esta ubicación. Sin embargo, no solo esto lo hace especial, sino su ubicación en un enclave periurbano, el mosaico dinámico entre civilización, bosques maquias y matorrales le proporcionan un gran valor natural. Es destacable la complejidad del equilibrio de los distintos ecosistemas existentes.

#### Clima del área

El clima de la zona de muestreo está inmerso en la zona de influencia del clima mediterráneo, con inviernos más o menos suaves y veranos secos y calurosos.

Dentro del clima general que define el área de estudio, es evidente la existencia de microclimas dependiendo del enclave, la topografía del terreno, el efecto termorregulador del mar, la dirección del viento, la insolación, la cobertura vegetal y su tipología, entre otras características. La zona de estudio está ubicada en la umbría de una pequeña colina, con vientos predominantes del sudoeste (Tabla 3-7).

Tabla 3-7.- Resumen de la climatología del área de estudio (Collserola). Fuente: Atlas Climàtic de Catalunya

<b>Temperatura media anual</b>	14 a 15 °C
<b>Temperatura media del mes de enero</b>	9-10 °C
<b>Temperatura media del mes de julio</b>	22-24°C
<b>Amplitud térmica anual</b>	16 a 17°C
<b>Precipitación media anual</b>	600 a 650 mm
<b>Régimen pluviométrico estacional</b>	TPHE
<b>Déficit hídrico anual (según Thornthwaite)</b>	200 a 300 mm.
<b>Evapotranspiración potencial</b>	712 a 855 mm Mesotérmica II (B'2)
<b>Eficacia térmica (verano)</b>	48 % a 51,9 % (b'4)
<b>Tipo de clima, según el índice de humedad de Thornthwaite</b>	-20 a 0 Seco subhúmedo (C1)
<b>Irradiación media anual (MJ/m<sup>2</sup>)</b>	13.6
<b>Viento medio anual (60 m)</b>	< 19.8 Km/h

### El hábitat

La Serra de Collserola, se sitúa en la cordillera Litoral y está flanqueada por los dos valles fluviales cercanos a la ciudad de Barcelona, los ríos Besos y Llobregat. Se trata de una zona de relieves suaves y de baja altura, con predominio de pizarras con afloramientos puntuales de rocas ígneas y zonas de calizas.

La Serra de Collserola, presenta zonas con predominio de la encina en zonas de umbría (*Quercetum ilicis galloprovinciale*), extensiones generosas de pino blanco, algunas zonas de ambiente acuático con una singular vegetación de ribera, matorrales densos y todo ello ubicado en un ambiente urbanizado (Figura 3-8).



Figura 3-8.- Imagen aérea de Collserola. Detalle de la zona de captura de los animales de estudio (Fuente: Google earth)

La zona control de Collserola, se encuentra a pocos metros del Plan d'Espais d'Interés Natural de la Serra de Collserola. Con más de 7500 ha de pinos mediterráneos y reductos de encinas, más o menos importantes, este espacio representa un espacio de especial interés dada su complejidad y el difícil equilibrio. Al sud, sudoeste tiene diversos Hàbitat d'Interés comunitari No prioritari compuesto por Pinares mediterráneos (Código: 9540) y Encina y carrascar (Código 9340)

Las capturas se realizaron en el Parque Natural de Collserola durante finales del año 2001 y principios del 2002, en el interior de una zona boscosa, con condiciones biogeográficas similar

a las zonas de los vertederos. Se trata de una zona cercana a un *Hábitat de Interés Comunitario*, (Directiva 92/43/CE), rodeado de núcleos urbanos altamente industrializados del área metropolitana de Barcelona (Figura 3-8).

## 3.2 Material y Métodos

### Trampeo, eficiencia y esfuerzo de captura

Para capturar ejemplares de *Apodemus sylvaticus* se utilizaron trampas de vivo tipo Sherman. Las trampas Sherman tienen la ventaja de no dañar al animal y protegerlo de las inclemencias del exterior hasta el momento de la recogida, por lo que, después de la manipulación, es posible retornar el animal al lugar de donde ha sido capturado. El cebo atrayente utilizado fue harina, atún y aceite que, mezclados, constituyen el cebo que mejores resultados nos ha dado.

Las trampas fueron colocadas antes del ocaso, en el torrente de drenaje de la balsa de lixiviados de los depósitos controlados o en los torrentes secos, en caso de los controles, a una distancia aproximada de 5 metros entre ellas. Las trampas se revisaron por la mañana del día siguiente. Se evaluó el total de animales capturados y el número de trampas colocadas para determinar la eficiencia de captura, el número de individuos y la especie capturada.

Los resultados del esfuerzo de las capturas se expresaron como el porcentaje de trampas totales colocadas y el número de capturas.

### Pesos y medidas morfométricas

Cada animal fue sexado y pesado antes de la obtención de las muestras. Los animales usados para el estudio fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

Una vez los animales fueron sacrificados se tomaron las medidas morfométricas mediante un pie de rey. Las medidas morfométricas tomadas fueron: Longitud cabeza-cola, longitud de la cola (descartando los animales con la cola cortada), longitud de la extremidad posterior y longitud de la oreja.

Los resultados se expresaron como la Media (en milímetros)  $\pm$  desviación estándar (SD), según la localización de captura.

Para estimar las condiciones fisiológicas se realizó una regresión lineal entre los logaritmos del peso (BW) y de la longitud de los animales (BL) para finalmente calcular un índice de condición corporal (BCI), para cada ratón, como el cociente entre los valores observados y esperados del peso corporal (Jakob, Marshall, and Uetz 1996).

### Hematología

En el estudio comparativo entre depósitos controlados, la sangre se extrajo del plexo periorbital y se conservó a temperatura ambiente hasta la lectura. La obtención del valor

hematocrito se realizó mediante la centrifugación de capilares con sangre a 12000 rpm durante 5 minutos. Los resultados se expresaron en porcentaje de la masa celular respecto al volumen total del hematocrito.

En el estudio específico del DC de Garraf, se extrajeron aproximadamente  $500 \pm 250 \mu\text{L}$  de sangre del plexo periorbital mediante capilares heparinizados. El recuento celular se llevó a cabo mediante un contador de partículas Coulter Multi-sizer y la determinación de las subpoblaciones nucleadas sanguíneas se obtuvo mediante un citómetro de flujo Coulter XL (Beckman). Los resultados del hemograma se expresaron como la media del número de cada tipo celular  $\pm$  desviación estándar (SD).

### **Histología**

Durante la necropsia se extrajeron los siguientes órganos: bazo, riñón izquierdo, pulmones e hígado. Dichos órganos fueron pesados en una balanza de precisión (SCALTEC, SBA42). Se tomaron pequeñas porciones de cada órgano y se conservaron un mínimo de 7 días en formaldehído tamponado al 10%. Posteriormente, las muestras se conservaron en etanol al 70% hasta el momento de englobarlas en moldes de parafina.

Antes de la confección de los bloques de parafina, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación ascendente y posteriormente se les dio un baño en tolueno durante 40 minutos, para empezar con la inclusión en parafina (Paraplast Histocomp PF 55-58 °C).

Tras la inclusión en parafina, se confeccionaron los bloques de parafina. Se realizaron cortes de  $5 \mu\text{m}$  con un micrótomo Leyca 2140, de cuchillas desechables, y fueron depositados en agua desionizada con gelatina, para ser capturados con portaobjetos.

La tinción se practicó en cubetas manuales mediante una modificación de la tinción clásica de Hematoxilina - Eosina con los siguientes pasos: Xileno (10 minutos) + Alcohol 96° (5 minutos) + Alcohol 70°-formol 10% (9:1) (10 minutos) + Agua destilada (5 minutos) + Hematoxilina (6 minutos) + Agua básica (pH:9)(10 minutos) + Eosina (5 minutos) + Alcohol absoluto (1 minuto) + Alcohol absoluto (5 minutos) + Alcohol absoluto (10 minutos) + Eucaliptol (10 minutos) (Comunicación personal de Miquel Borràs).

Tras la tinción se realizó el montaje con cubreobjetos y DPX, dejando secar durante 24 horas. Las preparaciones se observaron en un microscopio Nikon E400 con una cámara Leyca acoplada.

Se analizaron un mínimo de tres secciones de cada muestra. Las lesiones histológicas fueron cuantificadas según una escala convencional de 0 a 4, de acuerdo con su severidad y extensión (**Score**), siendo 0 las observaciones sin patología asociada, 1 con lesiones leves y

observadas esporádicamente, 2: con alteraciones y relativa frecuencia, 3 con lesiones de observación y extensión moderada, 4: patologías ampliamente extendidas por el órgano.

Los resultados de las observaciones se tabularon por órganos y por patologías específicas de cada órgano. Multiplicando la severidad por el número de casos se obtuvo un *índice* de la patología. Los resultados se expresaron como el promedio del índice de las patologías de cada órgano. La variable Media devuelve el promedio del índice de las patologías observadas por localidad.

### **Análisis de metales pesados y otros elementos**

La determinación de los metales pesados y otros elementos de interés se realizó en hígado, riñón izquierdo y musculatura mediante una digestión ácida en frascos de teflón. Los tejidos fueron secados hasta peso constante a una temperatura de 60°C, durante 48 horas. La cantidad de 100 ± 25 mg de tejido seco fue digerido en 5 mL de ácido nítrico (Instra, Baker-Analysed) y 2 mL de ácido perclórico (Instra, Baker-Analysed) en frascos de teflón abiertos en un microondas Prolabo Microdigest A301 ubicado en una habitación blanca.

Las cuantificaciones de Cd, Pb, Al, Mo, Co, Hg, Zn, Cu y Cr fueron determinadas mediante un espectrómetro de masas de plasma de acoplamiento inductivo ELAN de Perkin-Elmer. - 6000 (ICP-MS), mientras que las determinaciones de Rb, Fe, Ca y Ba fueron determinadas por un espectrómetro óptico de plasma de acoplamiento inductivo Perkin-Elmer OPTIMA-3200RL (ICP-OES).

Los resultados de los niveles de metales pesados y otros elementos se expresaron como la media en µg elemento/ g de muestra (peso seco) ± SD.

### **Test de los micronúcleos (Micronucleus test)**

El test de micronúcleos se llevó a cabo mediante la realización de frotis de sangre en portaobjetos previamente desengrasados. La sangre fue fijada con metanol (10 minutos) y posteriormente teñida con el colorante MayGrünwald-Giemsa (Sigma) durante 15 minutos. Tras un lavado en agua desionizada, los portaobjetos fueron conservados deshidratados a temperatura ambiente hasta la observación.

Para cada individuo se contabilizaron el número de micronúcleos observados en 2000 eritrocitos en un microscopio Nikon E-200 con un objetivo con aceite de inmersión (x100) (OECD TG 474 2014).

Los resultados se expresaron como la media de micronúcleos en cada 1000 eritrocitos.

### **Ensayo del Cometa (Comet assay)**

El ensayo del cometa se llevó a cabo en el estudio en el DC de Garraf. La técnica evalúa el daño genético mediante la observación del porcentaje de DNA en la cola de los linfocitos circulantes. (Collins 2004; Fairbairn, Olive, and O'Neill 1995).

Se incluyeron 18  $\mu$ L de sangre completa en agarosa (LMP-Gibco) al 0,6% preparada en agua MilliQ y se colocó una fina capa en portaobjetos comerciales previamente recubiertos (Trevigen®). Los portaobjetos se colocaron en tampón de lisis (NaCl 2,5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, N-lauril-sarcosin al 1% (p / v) con Triton X-100 al 1% durante 1 hora a 4 ° C. Para facilitar el desenrollamiento del ADN de los linfocitos circulantes se mantuvieron los portaobjetos en tampón de electroforesis (Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM y NaOH 300 mM, pH  $\geq$  13). La migración del ADN fragmentado se realizó sometiendo a los portaobjetos a una electroforesis durante 30 minutos a 25 V y 300 mA a 4°C. Finalmente, las muestras se neutralizaron con tampón Tris 400 mM (pH 7,5) y los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para el análisis de imagen de los cometas, los portaobjetos se hidrataron y se tiñeron con 10  $\mu$ L de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los cometas se analizaron mediante una aplicación personalizada del programa de análisis de imágenes AnalySys®.

Los resultados de la cuantificación del ADN fragmentado se mostraron como la media  $\pm$  SD.

### **Bioquímica sérica**

La sangre se recogió en tubos eppendorfs heparinizados y se conservó a 4 °C hasta la obtención del suero; para ello se centrifugó la muestra sanguínea a 12000 r.p.m. durante 3 minutos en una centrífuga eppendorf 5415 D. El plasma obtenido se separó de la fracción celular y colocándose en cubetas SPOTCHEM® se conservó a -20 °C para su posterior lectura.

El análisis de las muestras se realizó en un equipo de análisis clínicos (SPOTCHEM®) usando tiras reactivas de cada elemento: GOT (Transaminasa Glutámico-Oxalacética, UI/L), GPT (Transaminasa Glutámico-Pirúvica, UI/L), Proteínas Totales (g/dL), Creatinina (mg/dL) y BUN (Blood Urea Nitrogen, mmol/l).

Los resultados se mostraron como la media de cada parámetro  $\pm$  SD.

### **Estadística**

La evaluación estadística se realizó usando el paquete estadístico SPSS Statistics versión 21 (IBM).

Las variables continuas se analizaron mediante la prueba de Levene, para comprobar la homocedasticidad de las varianzas. Posteriormente se aplicó el Modelo Lineal General, como estadísticos paramétricos, o el test de Kruskal-Wallis, como estadístico no paramétrico.

Las diferencias entre grupos con varianzas homocedásticas se obtuvieron a partir del HSD del test de Tukey, mientras que si las varianzas no eran iguales se usó el estadístico de Games Howell. En el caso de las variables no paramétricas se usó el estadístico de la U- Mann Whitney.

### 3.3 Resultados

#### Trampeo, eficiencia y esfuerzo de captura

Los resultados de las capturas por localización y por sexo se detallan en la Tabla 3-8. El esfuerzo de captura de los depósitos controlados, en total, fue de 671 trampas Sherman por noche para capturar un total de 49 ratones de campo, con una eficiencia de captura del 7,30%, mientras que la zona de referencia (Collserola) necesitó 192 trampas para capturar 30 individuos, con una eficiencia del 15,63% (Tabla 3-9).

Tabla 3-8.-Resumen de las capturas de *Apodemus sylvaticus* por localización

Localidad	Sexo	Capturas
Collserola	♂	16
	♀	14
	♂♀	30
DC Bellestar	♂	15
	♀	11
	♂♀	26
DC Can Mata	♂	5
	♀	3
	♂♀	8
DC Garraf	♂	7
	♀	8
	♂♀	15
Total	♂	43
	♀	36
	♂♀	79

Tabla 3-9.-Resumen del esfuerzo de captura de *Apodemus sylvaticus* por localización

Localización	Trampas/noche	Capturas	Esfuerzo de captura
Collserola	192	30	15,63%
DC Bellestar	175	26	14,86%
DC Can Mata	340	8	2,35%
DC Garraf	156	15	9,62%
<b>Total</b>	<b>863</b>	<b>79</b>	<b>9,27%</b>

### **Pesos y Medidas morfométricas**

Se ha realizado estadística descriptiva de los pesos de los animales (Tabla 3-10) y se han comparado las medidas morfométricas sin que parezca haber una relación entre longitudes tomadas y localización de captura (Tabla 3-11).

Los resultados muestran que los animales capturados en el DC de Garraf y el DC de Bellestar, tenían un peso medio superior al del depósito de Can Mata. Los animales capturados en Collserola, ubicación de referencia, fueron los que presentaron un peso significativamente más bajo. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los pesos machos y hembras según la localidad de captura.

Tras comparar las variables morfométricas no se observaron diferencias significativas que hicieran descartar la hipótesis nula. Tampoco se observaron diferencias entre grupos según la ubicación de captura.

Tabla 3-10.- Resumen de pesos de los pesos de los animales capturados

Localidad	Peso $\pm$ SD
Collserola	18,59* $\pm$ 4,44
DC Bellestar	23,51 $\pm$ 6,45
DC Can Mata	20,19 $\pm$ 2,68
DC Garraf	23,61 $\pm$ 4,75

Peso expresado en gramos (\* $p < 0,05$ )

Tabla 3-11.-Resúmenes de casos de las medidas morfométricas de los individuos capturados

Localidad	LCC	$\pm$ SD	LC	$\pm$ SD	LP	$\pm$ SD	LO	$\pm$ SD
Collserola	89,29	$\pm$ 9,06	87,20	$\pm$ 6,67	22,40	$\pm$ 0,87	16,21	$\pm$ 1,49
DC Bellestar	94,30	$\pm$ 10,71	85,74	$\pm$ 16,53	23,08	$\pm$ 1,09	16,89	$\pm$ 1,61
DC Can Mata	93,56	$\pm$ 8,84	85,35	$\pm$ 8,96	22,30	$\pm$ 0,87	16,52	$\pm$ 1,08
DC Garraf	115,87	$\pm$ 13,14	87,52	$\pm$ 4,45	23,36	$\pm$ 1,23	17,32	$\pm$ 1,08
<b>Total</b>	<b>96,17</b>	<b><math>\pm</math> 13,97</b>	<b>86,51</b>	<b><math>\pm</math> 11,55</b>	<b>22,89</b>	<b><math>\pm</math> 1,10</b>	<b>16,78</b>	<b><math>\pm</math> 1,46</b>

Unidades: mm; LCC: Longitud cabeza-cola; LC: Longitud de la cola; LP: Longitud de la extremidad posterior; LO: Longitud de la oreja

Con los datos obtenidos no se ha podido generar un modelo de regresión lineal que pudiera explicar alguna variable morfométrica relevante del individuo, con el fin de minimizar la manipulación de los animales, obteniendo el máximo de información.

Durante la necropsia macroscópica se extrajeron y registraron los pesos de órganos descritos en la Tabla 3-12. Tras la comparación de los pesos de los órganos, mediante el modelo lineal general, se han observado diferencias significativas entre las localidades de captura, en concreto en el peso del bazo, del hígado y del pulmón de los animales capturados en el DC de Bellestar.

Tabla 3-12.-Resúmenes de casos de los pesos de los órganos de los individuos de cada localidad.

Localidad	Bazo	±	SD	Hígado	±	SD	Riñón	±	SD	Pulmón	±	SD	Cerebro	±	SD
<b>Collserola</b>	0,03	±	0,02	0,82	±	0,24	0,10	±	0,02	0,13	±	0,02	0,55	±	0,09
<b>DC Bellestar</b>	0,11*	±	0,06	1,32*	±	0,61	0,15	±	0,03	0,20*	±	0,05	0,63	±	0,05
<b>DC Can Mata</b>	0,04	±	0,03	1,05	±	0,33	0,14	±	0,03	0,14	±	0,03	0,61	±	0,09
<b>DC Garraf</b>	0,07	±	0,02	1,12	±	0,15	0,13	±	0,01	0,16	±	0,02	0,60	±	0,02

(\* $p < 0,05$ )

Los valores del índice de la condición corporal de cada localización de estudio se detallan en la Figura 3-9. Los índices no mostraron diferencias significativas, pero mostraron variaciones entre las zonas de estudio.

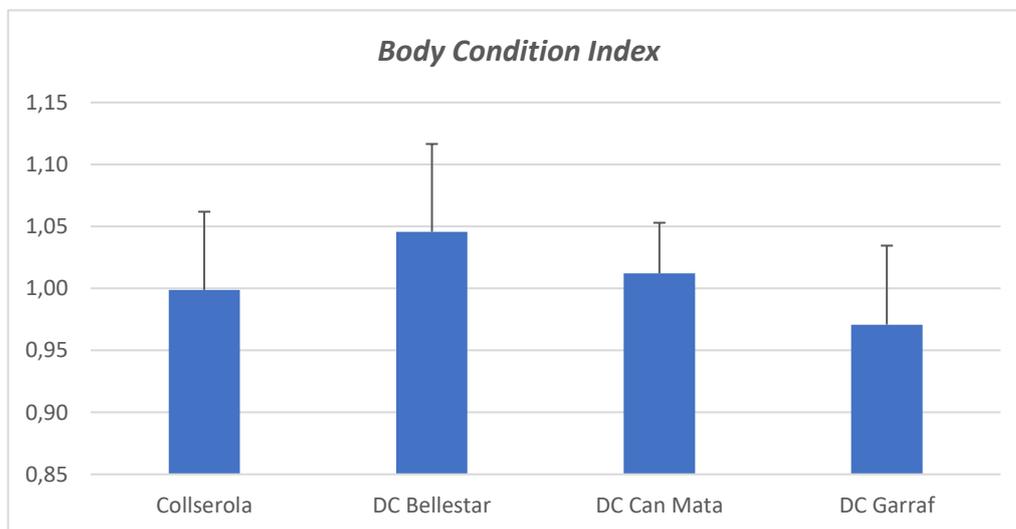


Figura 3-9.- Histograma de los índices de condición corporal de las zonas de estudio  $\pm$  desviación estándar (SD)

## **Hematología**

Para el estudio hematológico de los individuos capturados en los depósitos controlados, únicamente se pudo determinar el hematocrito (Tabla 3-13). Los resultados de los hematocritos no revelaron diferencias entre las zonas de estudio.

Tabla 3-13.- Resumen de la determinación de los hematocritos de las zonas de estudio

<b>Localidad</b>	<b>Hematocrito</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>
<b>Collserola</b>	46,46	±	4,54
<b>DC Bellestar</b>	44,88	±	5,00
<b>DC Can Mata</b>	46,31	±	3,76
<b>DC Garraf</b>	46,79	±	3,36

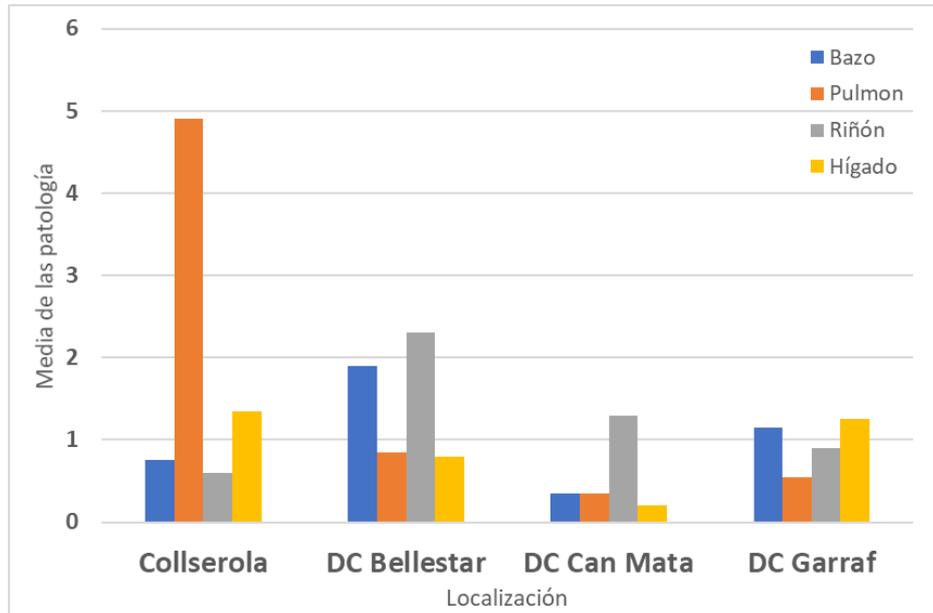
## **Histología**

El estudio histológico de los órganos de los individuos capturados se centró en el bazo, riñón, pulmón e hígado. Se realizó una observación de los cortes histológicos para determinar patologías relevantes de cada órgano. En algunos casos, el bazo presentó dimensiones de mayor medida, estos casos son conocidos con el nombre de *esplenomegalia*.

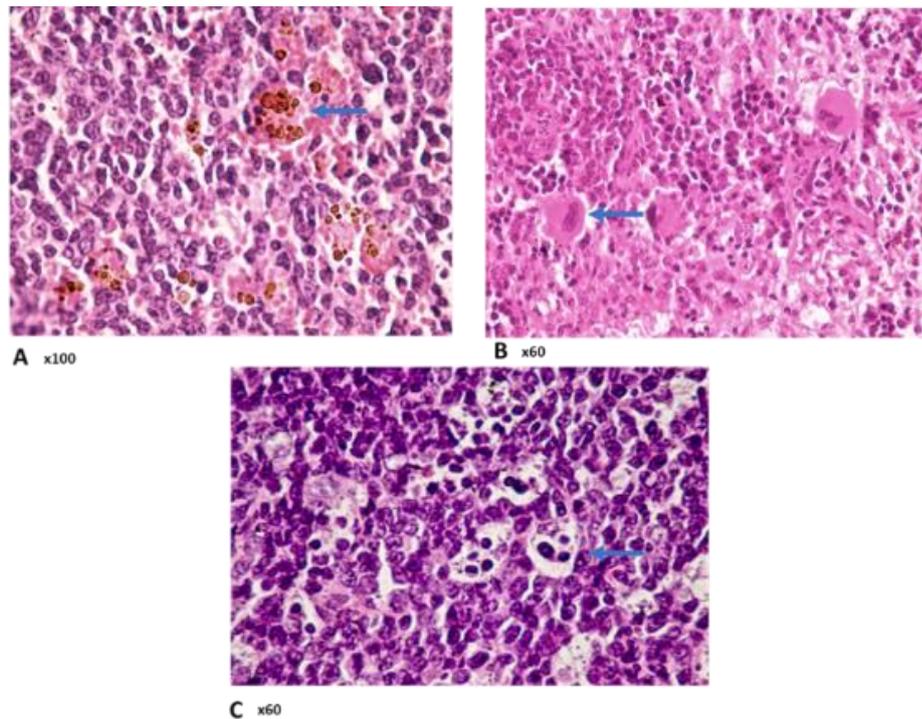
Las patologías relevantes encontradas por órgano se detallan a continuación:

- Bazo
  - **Hemosiderosis:** acumulación de hierro en forma de hemosiderina en los macrófagos esplénicos, en una proporción superior a la considerada normal.
  - **Esplenomegalia** (observación macroscópica): aumento del tamaño y/o del peso del bazo por encima de los valores medios considerados normales.
  - **Apoptosis linfocitaria (*Starry-sky*):** muerte celular por apoptosis en los linfocitos de los nódulos de Malpighi. La denominación inglesa (“cielo estrellado”) se refiere al aspecto de espacios puntuales en blanco sobre un fondo azul oscuro que presenta la vista al microscopio. Este fenómeno puede estar relacionado con la existencia de niveles altos de corticoides en sangre.
  - **Megacariocitos:** presencia inusualmente elevada de este tipo celular, frecuentemente relacionada con la actividad hematopoyética extramedular.
  
- Riñón

- **Almacenamiento Gutular Hialino:** acumulación de microgotas de material hialino, eosinófilo, en las células de los túbulos contorneados proximales.
  - **Nefritis intersticial:** reacción inflamatoria, normalmente de tipo crónico, en el intersticio del riñón, tanto en la zona cortical como en la zona medular.
- Pulmón
- **Pneumoconiosis:** acumulación de material particulado en los macrófagos alveolares.
  - **Engrosamiento de los septos alveolares:** aumento del número de capas celulares y/o de tejido intersticial en las paredes de los alveolos.
  - **Tejido linfático peribronquial:** aparición de reacción inflamatoria de tipo crónico (acumulaciones de linfocitos) adyacentes a bronquios o bronquiolos.
  - **Congestión:** exceso de eritrocitos en las luces vasculares.
- Hígado
- **Necrosis:** muerte celular, que suele afectar a un número elevado de células contiguas, con destrucción de la membrana celular y salida de enzimas líticas, frecuentemente acompañada de reacción inflamatoria.
  - **Apoptosis:** muerte celular, normalmente de células individuales, sin rotura de la membrana ni salida de enzimas. Los núcleos se convierten en grumos de cromatina desnaturalizada que, rodeados de un escaso citoplasma eosinófilo, se conocen como cuerpos apoptóticos.
  - **Depósitos de lipofuscina en células de von Kuppfer:** presencia de acúmulos de este pigmento, que es una mezcla compleja producto final de la peroxidación lipídica, en los macrófagos hepáticos fijos, de forma estrellada, conocidos como células de von Kuppfer. Este rasgo aparece frecuentemente ligado a la contaminación atmosférica de tipo oxidativo.
  - Presencia de **parásitos** hepáticos.

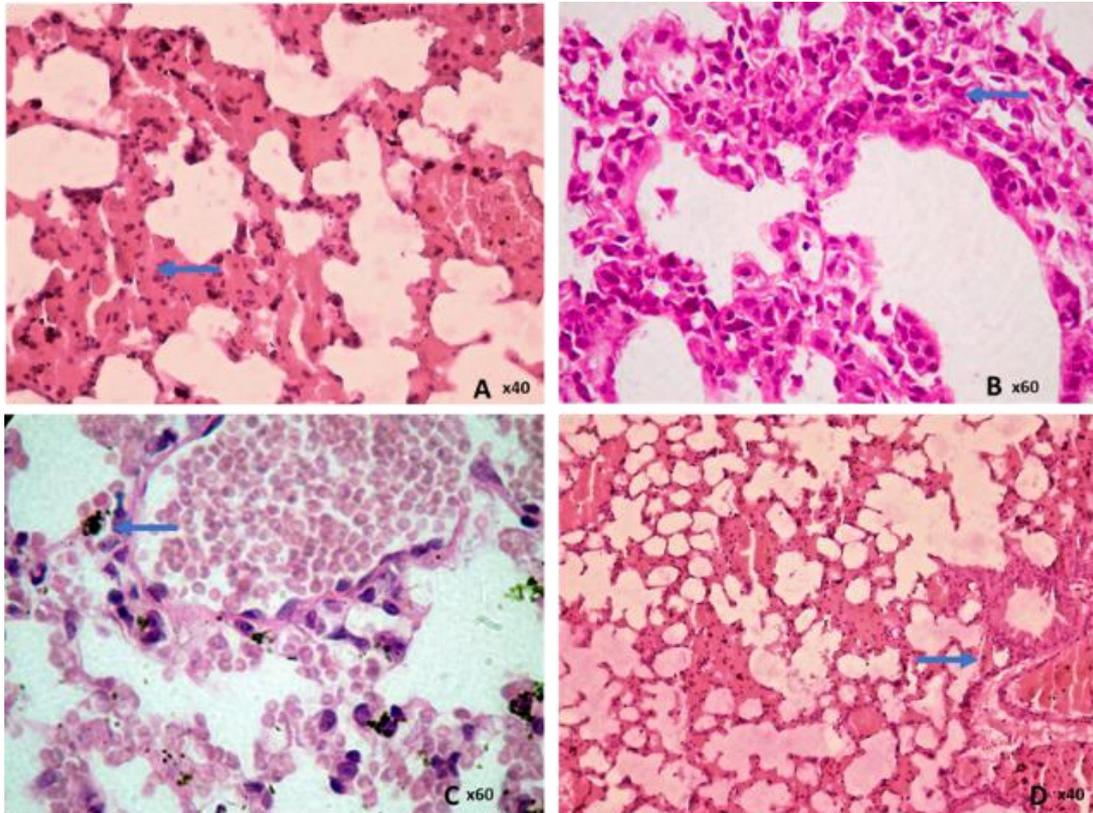


- *Figura 3-10.- Histograma de la media de las patologías observadas por zona de estudio*



- *Figura 3-11.- Detalle de las patologías observadas en el bazo de Apodemus sylvaticus. A: Hemosiderosis; B: Megacariocitos; C: Starry Sky*

Las valoraciones de las lesiones observadas se han resumido en la Figura 3-10. En el histograma se muestran el valor promedio del Índice, siendo el índice el valor ponderado del número de casos y la valoración otorgada (ver sección Histología).



*Figura 3-12.- Detalles de las patologías observadas en los Apodemus sylvaticus capturados en la zona de Collserola. A: Engrosamiento de los septos; B: Congestión pulmonar; C: Pneumoconiosis; D: Tejido linfático peribronquial*

Los individuos capturados en el DC de Bellestar son los que mostraron mayor número de patologías en el bazo (Figura 3-11). Mientras que los individuos estudiados del DC de Can Mata fueron los que presentaron menor número de patologías.

Los individuos capturados en el DC de Bellestar son los que mostraron mayor número de patologías en el riñón. Mientras que los individuos estudiados de la zona de Collserola fueron los que presentaron menor número de patologías.

Los individuos capturados en Collserola son los que mostraron mayor número de patologías en los pulmones (Figura 3-12). Destaca que se observó pneumoconiosis en la mitad de los

individuos estudiados. Mientras que los individuos estudiados de la DC Can Mata fueron los que presentaron menor número de patologías.

Los individuos capturados en Collserola son los animales que mostraron mayor número de patologías en el pulmón. Mientras que los individuos estudiados del DC de Can Mata fueron los que presentaron menor número de patologías en general.

### **Análisis de metales pesados**

El análisis de metales pesado se realizó en los órganos hígado, riñón y musculatura de los animales capturados en Collserola, DC Bellestar y DC Can Mata. Esta analítica no se realizó en muestras de individuos capturados en DC Garraf.

Los resultados del análisis de metales pesados y otros elementos analizados en el hígado se detalla en las tablas Tabla 3-14 y Tabla 3-17. La cantidad de Molibdeno encontrada en el hígado presentó diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) según la localidad de captura del individuo. En concreto, los individuos capturados en Collserola presentaron una cantidad de Molibdeno muy inferior a los capturados en el DC Bellestar ( $p < 0,01$ ) o en el DC Can Mata ( $p < 0,01$ ). Un comportamiento similar presentaron los valores analizados de Cobalto hallado en el hígado ( $p < 0,01$ ), siendo esta vez, los animales capturados en la zona de referencia los que presentaron una mayor cantidad de éste, frente a los capturados en el DC Bellestar ( $p < 0,05$ ) o los capturados en el DC Can Mata ( $p < 0,01$ ). Los resultados analizados de Rubidio, por otra parte, presentaron también diferencias según la zona de captura ( $p < 0,01$ ). En concreto los hígados del DC de Can Mata presentaron una cantidad muy inferior comparados con los determinados en el DC de Bellestar ( $p < 0,05$ ) o con los de Collserola ( $p < 0,01$ ).

En el riñón se analizaron un total de 9 metales pesados y 4 elementos adicionales (Tabla 3-15 y Unidades:  $\mu\text{g/g}$  (peso seco) ; \* $p < 0,05$

Tabla 3-18). Los resultados obtenidos tuvieron un comportamiento similar a los obtenidos en el hígado, las diferencias entre localidades se encontraron en el Molibdeno, el Cobalto y el Rubidio. La cantidad de Molibdeno encontrada en el riñón presentó diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) según la localidad de captura del individuo. En concreto, los individuos capturados en Collserola presentaron una cantidad de Molibdeno muy inferior a los capturados en el DC Bellestar ( $p < 0,01$ ) o en el DC Can Mata ( $p < 0,01$ ). Un comportamiento similar, presentaron los valores analizados de Cobalto hallado en el riñón ( $p < 0,01$ ), siendo esta vez, los animales capturados en la zona de referencia los que presentaron una mayor cantidad de este frente a los capturados en el DC Bellestar ( $p < 0,01$ ) o los capturados en el DC Can Mata ( $p < 0,01$ ). Los resultados analizados de Rubidio, por otra parte, presentaron también diferencias según la zona de captura ( $p < 0,01$ ). En concreto los riñones analizados del DC de Can Mata

presentaron una cantidad muy inferior comparados con los de Collserola ( $p < 0,01$ ) pero no presentaron diferencias con los de DC Bellestar.

Se realizaron también determinaciones de 8 metales pesados y otros 3 elementos en la musculatura, en concreto, en la musculatura de ambas extremidades inferiores (Tabla 3-14-Tabla 3-19). Sin embargo, dado el escaso número de muestras solo se realizó la estadística del análisis de Cadmio, Plomo y Cromo. Las determinaciones de plomo acumuladas en musculatura presentaron diferencias según la zona de captura ( $p < 0,01$ ), siendo la localidad del DC Can Mata la que presentó mayores cantidades respecto al DC Bellestar ( $p < 0,05$ ) o de Collserola ( $p < 0,01$ ).

Tabla 3-14.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en el hígado

Localidad	Cd	± SD	Pb	± SD	Al	± SD	Mo	± SD	Hg	± SD	Zn	± SD	Cu	± SD	Cr	± SD	Co	± SD
<b>Collserola</b>	0,30	± 0,33	0,11	± 0,12	5,42	± 8,02	0,80*	± 0,97	0,11	± 0,12	88,96	± 30,30	14,82	± 5,17	0,68	± 0,76	0,40	± 0,24
<b>DC Bellestar</b>	0,18	± 0,15	0,19	± 0,47	3,54	± 4,48	2,21	± 1,01	0,22	± 0,45	106,79	± 51,00	16,22	± 4,05	0,48	± 0,37	0,21	± 0,18
<b>DC Can Mata</b>	0,13	± 0,12	0,12	± 0,07	2,76	± 1,36	2,81	± 0,81	0,07	± 0,02	85,58	± 13,58	14,05	± 2,00	0,75	± 0,18	0,05*	± 0,03

Unidades: µg/g (peso seco); \*p<0,05

Tabla 3-15.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en el riñón

Localidad	Cd	± SD	Pb	± SD	Al	± SD	Mo	± SD	Hg	± SD	Zn	± SD	Cu	± SD	Cr	± SD	Co	± SD
<b>Collserola</b>	1,13	± 1,03	0,32	± 0,25	2,28	± 3,62	0,26*	± 0,22	0,39	± 0,30	78,80	± 8,69	15,00	± 2,19	1,08	± 1,11	0,88	± 0,53
<b>DC Bellestar</b>	1,15	± 1,44	0,29	± 0,23	8,03	± 10,10	1,59	± 0,47	0,21	± 0,24	78,40	± 14,12	15,13	± 1,97	0,79	± 0,94	0,18	± 0,11
<b>DC Can Mata</b>	0,52	± 0,54	0,48	± 0,48	2,33	± 1,53	1,61	± 0,34	0,35	± 0,13	77,62	± 7,05	15,20	± 1,18	0,63	± 0,16	0,07*	± 0,05

Unidades: µg/g (peso seco); \*p<0,05

Tabla 3-16.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en la musculatura

Localidad	Cd	± SD	Pb	± SD	Al	± SD	Mo	± SD	Hg	± SD	Zn	± SD	Cu	± SD	Cr	± SD
<b>Collserola</b>	0,02	± 0,02	0,04	± 0,03	5,47	± 2,84	0,03	± 0,02	0,07	± 0,06	38,90	± 7,06	5,30	± 0,51	0,58	± 0,35
<b>DC Bellestar</b>	0,01	± 0,01	0,06	± 0,05	17,37	± 0,58	0,15	± 0,06	0,09	± 0,03	74,32	± 12,32	6,83	± 1,11	0,71	± 0,81
<b>DC Can Mata</b>	0,01	± 0,00	0,14*	± 0,09	12,42	± 5,22	0,10	± 0,03	0,04	± 0,01	50,64	± 27,49	5,64	± 0,66	0,81	± 0,20

Unidades: µg/g (peso seco); \*p<0,05

Tabla 3-17.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en el hígado

Localidad	Rb	± SD	Fe	± SD	Ca	± SD	Ba	± SD
<b>Collserola</b>	26,92	± 16,33	316,33	± 114,69	198,35	± 57,21	0,11	± 0,07
<b>DC Bellestar</b>	21,06	± 14,47	365,69	± 172,74	225,42	± 166,58	0,38	± 0,52
<b>DC Can Mata</b>	6,27*	± 1,91	372,10	± 137,25	137,26	± 43,12	0,17	± 0,15

Unidades: µg/g (peso seco) ; \*p<0,05

Tabla 3-18.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en el riñón

Localidad	Rb	± SD	Fe	± SD	Ca	± SD	Ba	± SD
<b>Collserola</b>	26,26	± 15,36	259,39	± 61,12	332,50	± 116,40	0,10	± 0,10
<b>DC Bellestar</b>	16,86	± 12,16	338,93	± 142,79	254,68	± 101,79	0,31	± 0,44
<b>DC Can Mata</b>	5,42*	± 1,82	325,59	± 142,16	300,74	± 75,51	0,15	± 0,11

Unidades: µg/g (peso seco) ; \*p<0,05

Tabla 3-19.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en la musculatura

Localidad	Rb	± SD	Fe	± SD	Ca	± SD
<b>Collserola</b>	22,99	± 10,46	41,67	± 10,92	1759,13	± 1369,62
<b>DC Bellestar</b>	16,77	± 0,42	76,10	± 6,43	1866,25	± 109,25
<b>DC Can Mata</b>	6,48	± 2,45	42,25	± 20,02	2572,54	± 3163,14

Unidades: µg/g (peso seco)

### **Micronucleus test**

Se realizó una observación microscópica de frotis de sangre y se registró el número de micronúcleos. Se contabilizaron una media de 2000 eritrocitos y se calculó el número de micronúcleos por cada 1000 eritrocitos de los individuos capturados en las 3 localidades de estudios y la localidad de referencia. La comparación de los micronúcleos observados mostró que existían diferencias entre las localidades de captura. (Tabla 3-20).

Tabla 3-20.- Resumen de casos de los Micronúcleos observados por cada 1000 eritrocitos.

Localidad	Media	± SD
<b>Collserola</b>	3,42	± 0,86
<b>DC Bellestar</b>	4,73	± 1,86
<b>DC Can Mata</b>	3,22*	± 0,35
<b>DC Garraf</b>	4,05	± 0,35

\*p<0,05

### **Comet assay**

También se llevó a cabo un ensayo de evaluación de la rotura del ADN en linfocitos circulantes mediante el Comet assay (Tabla 3-21). Los resultados mostraron que el DC de Garraf presentaba menor rotura del ADN respecto a los otras zonas estudiadas, sin embargo, esta diferencia, al ser tan poca, no resulta relevante.

Tabla 3-21 .-Resumen de casos del porcentaje de ADN en la cola de los linfocitos de los individuos estudiados

Localidad	% ADN	±	SD
Collserola	33,40	±	0,99
DC Bellestar	32,73	±	1,73
DC Can Mata	32,68	±	1,00
DC Garraf	30,50	±	3,76

### **Bioquímica sérica**

Se realizaron determinaciones séricas de los perfiles hepáticos (GPT/GOT) y renales (creatinina/BUN). Las determinaciones bioquímicas revelaron evidentes diferencias entre las localidades de captura (Tabla 3-22). Cabe destacar el elevado valor medio de la GPT y GOT en DC Garraf respecto al resto y el bajo valor medio de los parámetros GPT, GOT y creatinina en la zona de referencia.

Tabla 3-22.- Resumen de las determinaciones de los parámetros de bioquímica sérica analizados

Localidad	GPT	±	SD	GOT	±	SD	Cr	±	SD	BUN	±	SD
Collserola	20,14	±	7,08	59,13	±	50,24	0,68	±	0,21	33,06	±	25,66
DC Bellestar	35,13	±	13,29	66,25	±	35,27	0,73	±	0,14	20,00	±	6,47
DC Can Mata	57,57	±	26,02	63,00	±	33,37	0,76	±	0,38	19,86	±	6,82
DC Garraf	115,54	±	30,70	118,36	±	44,99	0,75	±	0,13	15,00	±	4,42

GOT (Transaminasa Glutámico-Oxalacética, UI/L), GPT (Transaminasa Glutámico-Pirúvica, UI/L), Creatinina (mg/dL) y BUN (Blood Urea Nitrogen, mmol/L).

## El Depósito Controlado de Garraf

### Pesos y Medidas morfométricas

En el estudio del Depósito de Garraf se capturaron un total de 56 (29/27) animales en la 4 zonas según se detalla en la Tabla 3-23.

En todas las localizaciones donde se capturaron animales se observa que el peso de las hembras siempre es inferior al de los machos capturados. Sin embargo, no se apreciaron diferencias entre los pesos de los animales según la zona de captura.

*Tabla 3-23.- Resumen de casos de los pesos de los animales capturados distribuidos por sexo y localidad de captura.*

<b>Localidad</b>	<b>Sexo</b>	<b>N</b>	<b>Peso</b>	<b>± SD</b>
<b>Control Garraf</b>	♂	10	23,13	± 4,04
	♀	8	17,24	± 5,10
	♂♀	18	20,51	± 5,33
<b>DC Garraf</b>	♂	8	27,14	± 2,79
	♀	6	18,90	± 1,05
	♂♀	14	23,61	± 4,75
<b>DC Garraf+ 2km</b>	♂	6	23,04	± 3,22
	♀	8	19,69	± 5,01
	♂♀	14	21,13	± 4,52
<b>DC Garraf + 4Km</b>	♂	5	23,81	± 3,93
	♀	5	20,26	± 1,81
	♂♀	10	22,03	± 3,44
<b>Total</b>	♂	29	24,34	± 3,80
	♀	27	18,89	± 3,99
	♂♀	56	21,71	± 4,73

Durante la necropsia no se observaron aspectos destacables que sean motivo de mención. Se extrajeron los órganos detallados en la Tabla 3-24 y se pesaron. El estudio estadístico de los pesos reveló que los pesos los bazos de los animales capturados en el DC Garraf fueron superiores a los capturados en la zona Control ( $p < 0,05$ ). También se observó que el peso de los pulmones de los animales capturados en la zona control fue muy superior al de las otras zonas ( $p < 0,01$ ).

Tabla 3-24.- Resumen de los pesos de los órganos de los animales estudiados distribuidos por la zona de captura.

Localidad	Bazo ± SD	Hígado ± SD	Riñón ± SD	Pulmón ± SD
Control Garraf	0,05* ± 0,02	1,12 ± 0,32	0,13 ± 0,03	0,62* ± 0,06
DC Garraf	0,07 ± 0,02	1,12 ± 0,15	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,02
DC Garraf+ 2km	0,07 ± 0,02	1,04 ± 0,18	0,13 ± 0,02	0,33 ± 0,22
DC Garraf + 4Km	0,06 ± 0,02	1,02 ± 0,31	0,13 ± 0,01	0,26 ± 0,20
<b>Total</b>	<b>0,06 ± 0,02</b>	<b>1,08 ± 0,25</b>	<b>0,13 ± 0,02</b>	<b>0,30 ± 0,21</b>

Peso (g);  $p < 0,05$

Durante el proceso de revisión y procesado de los animales se recogieron las longitudes de diferentes zonas corporales (Tabla 3-25) de las localidades estudiadas en el DC de Garraf (VG, 2VG y 4VG). Sin embargo, no se pudieron recoger las longitudes de la zona control.

El análisis de los datos registrados mostró diferencias entre las longitudes corporales de los animales capturados en el DC Garraf y el resto de las localidades.

Tabla 3-25.- Resumen de las longitudes registradas de los animales estudiados distribuidas por la zona de captura.

Localidad	LCC ± SD	LO ± SD	LA ± SD	LO ± SD
DC Garraf	115,87* ± 13,14	23,36 ± 1,23	25,46 ± 1,61	17,32 ± 1,08
DC Garraf+ 2km	101,47 ± 10,51	23,20 ± 1,82	24,75 ± 2,90	19,19 ± 3,51
DC Garraf + 4Km	103,11 ± 9,65	23,68 ± 1,09	25,26 ± 1,13	17,25 ± 1,58
<b>Total</b>	<b>107,20 ± 12,94</b>	<b>23,39 ± 1,42</b>	<b>25,14 ± 2,07</b>	<b>18,01 ± 2,51</b>

Unidades: mm; LCC: Longitud cabeza-cola; LP: Longitud de la extremidad posterior; LA: Longitud de la extremidad anterior; LO: Longitud de la oreja;  $p < 0,05$

### Hematología

Las comparaciones entre las zonas de captura de los animales se realizaron entre la zona de influencia de la balsa de lixiviados y las distancias descritas a lo largo del torrente de drenaje. El objetivo del estudio hematológico, en este caso, tuvo como hipótesis nula verificar que las determinaciones de los hematocritos y el conteo de las diferentes poblaciones celulares de la sangre eran iguales desde la balsa de lixiviados y los puntos de captura a 2 km y 4 km, torrente abajo. Sin embargo, el análisis estadístico desveló diferencias relevantes en el número de eritrocitos y de la línea blanca entre el DC de Garraf y el resto de las localizaciones.

Las comparaciones de los valores obtenidos en la determinación del hematocrito no muestran diferencias entre las zonas de captura (Tabla 3-26). Se realizó también un estudio de las poblaciones celulares de la sangre (Tabla 3-27; Tabla 3-28).

Tabla 3-26.- Resumen de los hematocritos de los animales estudiados distribuidas por la zona de captura.

Localidad	Hematocrito $\pm$ SD	
DC Garraf	46,79	$\pm$ 3,36
DC Garraf+ 2km	49,98	$\pm$ 4,82
DC Garraf + 4Km	48,30	$\pm$ 3,23

Tabla 3-27.- Resumen de las medias de los eritrocitos, leucocitos y linfocitos de los animales estudiados distribuidos por la zona de captura.

Localidad	Eritrocitos $\pm$ SD		Leucocitos $\pm$ SD		Linfocitos $\pm$ SD	
DC Garraf	18448,33*	$\pm$ 14135,98	526,42*	$\pm$ 402,32	462,67*	$\pm$ 348,62
DC Garraf+ 2km	9249,29	$\pm$ 3222,05	283,87	$\pm$ 145,56	249,44	$\pm$ 128,24
DC Garraf + 4Km	7022,22	$\pm$ 4962,93	142,37	$\pm$ 103,19	126,88	$\pm$ 100,19

Células x1000/mL

Tabla 3-28 Resumen de las medias de los monocitos y granulocitos de los animales estudiados distribuidos por la zona de captura.

Localidad	Monocitos $\pm$ SD		Granulocitos $\pm$ SD	
DC Garraf	48,35*	$\pm$ 46,48	15,24*	$\pm$ 14,11
DC Garraf+ 2km	30,66	$\pm$ 28,93	3,77	$\pm$ 2,43
DC Garraf + 4Km	8,03	$\pm$ 5,20	7,22	$\pm$ 3,56

Células x1000/mL

### **Histología**

Las valoraciones medias de las patologías observadas se han resumido en la Figura 3 13. En la Figura 3 14 se muestran imágenes de las patologías hepáticas observadas.

Los individuos capturados en el tramo de 2 km torrente abajo de la balsa de lixiviados son los que mostraron mayor número de patologías, y en concreto, patologías relacionadas con el bazo y con el riñón. Mientras que los individuos estudiados capturados a 4 Km fueron los que mostraron menor número de lesiones.

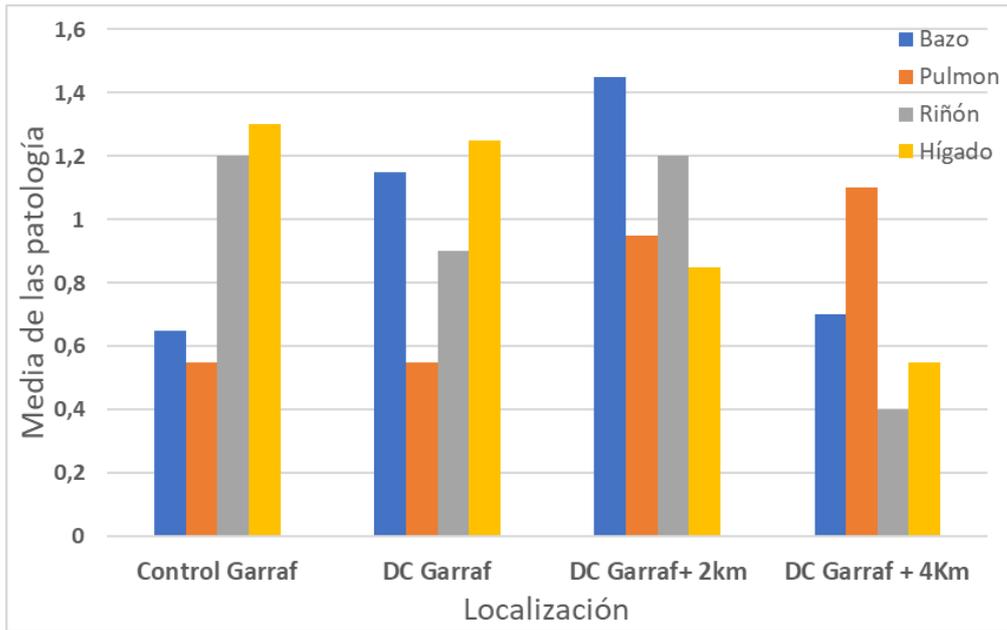


Figura 3-13.-Resumen de los valores medios de las patologías observados por cada punto de estudio.

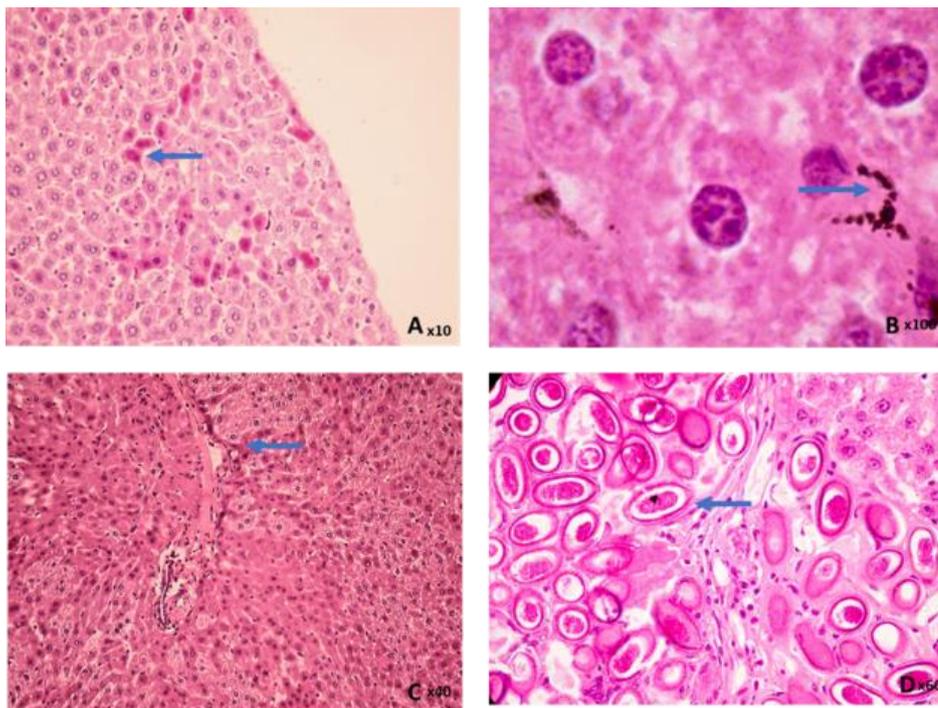


Figura 3-14.- Detalle de las patologías observadas en los hígados de Apodemus sylvaticus. A: Apoptosis en hepatocitos; B: depósitos de lipofuscina en células de Kuffer; C: Necrosis hepática; D: Detalle de parásitos hallados en el hígado

Los resultados revelan que hay un gradiente inversamente proporcional entre la distancia a la balsa de lixiviados y las lesiones hepáticas observadas. Por otro lado, se observa un gradiente proporcional entre la distancia a la balsa de lixiviados y las patologías pulmonares observadas.

### **Micronucleus test**

Se realizó una observación microscópica de frotis de sangre y se registró el número de corpúsculos de micronúcleos. Se contabilizaron una media de 2000 eritrocitos y se calculó el número de micronúcleos por cada 1000 eritrocitos de los individuos capturados en las 3 localidades de estudios y la localidad de referencia. La comparación de los micronúcleos observados mostró que existían diferencias entre las localidades de captura ( $p < 0,05$ ). En la Figura 3-15 se observa que a medida que nos alejamos de la balsa de lixiviados incrementa el número de micronúcleos observados (Figura 3-15).

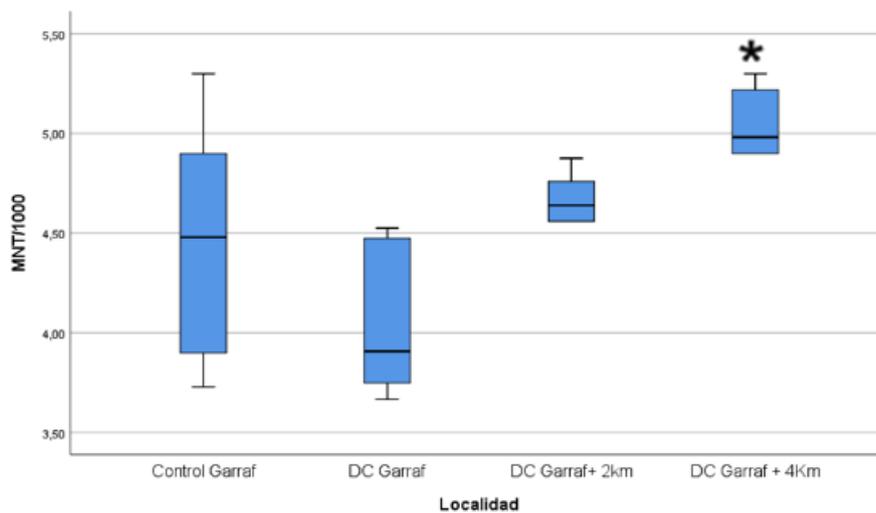


Figura 3-15 Diagrama de cajas de los micronúcleos registrados por cada 1000 eritrocitos. \*  $p < 0,05$

### **Comet test**

El estudio de la fragmentación del ADN en linfocitos circulantes realizado mediante el Comet assay no mostró diferencias entre las localidades estudiadas (Tabla 3-29). El estudio muestra los valores en el DC Garraf y las áreas de influencia de la balsa de lixiviados, no pudiéndose comparar con lo observado en la zona control del estudio. En la tabla se ha incorporado el valor del control de Collserola, referenciado anteriormente, donde se observa que los valores son similares a los obtenidos en este estudio particular del DC Garraf.

Tabla 3-29 Resumen de los porcentajes de ADN en la cola de los linfocitos circulantes

Localidad	% DNA	± SD
DC Garraf	30,50	± 3,76
DC Garraf+ 2km	34,00	± 6,54
DC Garraf + 4Km	30,94	± 2,87
Collserola	33,40	± 0,99

### **Bioquímica sérica**

Se realizaron determinaciones séricas de los perfiles hepáticos (GPT/GOT) y perfiles renales (creatinina/BUN). Adicionalmente se determinó la cantidad de proteínas totales presentes en el sérum. Las determinaciones bioquímicas revelaron evidentes diferencias entre las localidades de captura (Tabla 3-30). Cabe destacar el elevado valor medio de los valores de GPT y GOT en toda la zona de influencia del DC Garraf respecto a la zona control. Por otro lado, cabe destacar que la zona de captura DC Garraf + 2 Km presentó los mayores valores medios de proteínas totales, GPT, GOT y BUN.

Tabla 3-30 Resumen de las determinaciones por bioquímica sérica.

Localidad	PT	± SD	GPT	± SD	GOT	± SD	Cr	± SD	BUN	± SD
Abdera-Control Garraf	6,56	± 0,95	48,47*	± 38,35	58,41*	± 27,65	0,78	± 0,12	13,81	± 2,17
DC Garraf	6,61	± 0,38	115,54	± 30,70	118,50	± 45,19	0,75	± 0,13	15,00	± 4,42
DC Garraf + 2 Km	6,81	± 0,56	137,93	± 78,76	177,69	± 142,68	0,79	± 0,22	20,71	± 10,26
DC Garraf + 4Km	6,33	± 0,62	87,30	± 34,56	151,50	± 77,93	0,87	± 0,29	15,78	± 1,86

PT (Proteínas Totales; g/dL), GOT (UI/L), GPT (UI/L), Cr (Creatinina (mg/dL)) y BUN (mmol/l). \*  $p < 0,05$

### **3.4 Discusión**

Los depósitos controlados son instalaciones destinadas a la eliminación de residuos que ya no pueden revalorizarse ni reutilizarse. La acumulación de estos residuos, a lo largo de los años, produce emisiones ambientales indeseadas de gases (biogás) y lixiviados. Actualmente, la gestión de los depósitos controlados ha variado mucho respecto desde la época en las que se realizó el estudio, hasta el punto de que el nombre que recibían estas instalaciones era el de vertederos.

En el estudio de comparación entre vertederos, se examinaron diferentes biomarcadores de efecto y se determinó la acumulación de metales pesados, como biomarcador de exposición, en ratones de campo capturados en las zonas de influencia de la balsa de lixiviados de los depósitos controlados de residuos.

### **Trampeo, eficiencia y esfuerzo de captura**

La media del esfuerzo de captura en los diferentes depósitos controlados estuvo en consonancia con los estudios descritos por Sánchez-Chardi (2007), sin embargo, el esfuerzo de captura en la zona de referencia fue superior en el presente estudio.

Las capturas de *Apodemus sylvaticus* en las zonas de estudio no mostraron variaciones relevantes en función de la estación en la que fue capturado. Este hecho puede ser debido al aporte constante de nutrientes, de forma directa o indirecta, de un depósito controlado. Estudios de dinámica poblacional de *Apodemus sylvaticus* en latitudes similares muestran que las variaciones estacionales y la disponibilidad de alimento juegan un papel fundamental en la dinámica poblacional del ratón de campo (Sunyer et al. 2016).

### **Pesos y Medidas morfométricas**

Los datos de las variables morfométricas parecen estar de acuerdo con la bibliografía encontrada (Çolak et al. 2007; Çolak, Çolak, and Yiğit 2005; Gosálbez 1987).

En muchos estudios ambientales en los que se trabaja con bioindicadores, se usan métodos no invasivos para determinar la condición corporal de los individuos de una población. Esta condición, generalmente, se basa en la masa corporal y diferentes medidas del tamaño corporal.

La condición corporal, como estado fisiológico de los ejemplares capturados, ha sido usada durante muchos años como una herramienta valiosa para la gestión de poblaciones silvestres y para la evaluación de los efectos de la actividad humana sobre las mismas (Díaz and Alonso 2003; Nunes, Da Luz Mathias, and Crespo 2001; Peig and Green 2009, 2010). Por otro lado, el análisis de las medidas morfométricas se reconoce como un biomarcador significativo (Sanchez-Chardi et al. 2009; Sánchez-Chardi et al. 2007; Tête, Afonso, et al. 2014). Aunque este tipo de biomarcadores no son normalmente indicadores de un contaminante o grupo de contaminantes específico, sí son sensibles a las alteraciones inespecíficas causadas por la actividad antropogénica (Rodríguez-Estival and Smits 2016).

Aunque se han ensayado distintos índices de condición corporal, diversos estudios sugieren que el método que ofrece mayor significación es el que se basa en establecer una recta de correlación entre la longitud corporal y el peso, utilizando datos obtenidos en animales capturados en una zona ecológicamente equivalente a las zonas de estudio, pero libre de fuentes de contaminación, es decir, la zona que consideraremos control, y cuyos ejemplares adoptaremos como patrón o referencia de buen estado de salud. A continuación, utilizando esta recta, introduciremos los valores de longitud de los distintos animales de las zonas de estudio, y obtendremos el valor de peso “esperado” para cada individuo si perteneciera a la

población control. El BCI para cada individuo se define como el cociente entre el peso corporal observado (real) y el esperado (calculado). Para simplificar el cálculo, se procede en primer lugar a una transformación logarítmica de todas las series de datos implicadas.

En estas condiciones, un valor de BCI igual a 1 indicaría idealmente un estado de salud igual al de los animales control. Valores superiores a 1 representarían un almacenamiento de reservas superior a lo esperado, mientras que valores inferiores a 1 serían indicadores de un estado nutricional deficiente, que en diversos estudios ha demostrado estar correlacionado con un nivel menor de salud a nivel poblacional.

En lo que se refiere a la comparación entre las diversas localizaciones de estudio, los valores obtenidos no difieren significativamente, dentro de la variabilidad normalmente esperable entre poblaciones geográficamente separadas. Sin embargo, el análisis del Índice de la Condición Corporal, Body Condition Index (BCI), permite establecer determinadas tendencias entre localizaciones de captura.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que los animales del depósito Controlado de Can Mata presentan un BCI promedio prácticamente idéntico al de los controles, mientras que los BCI del depósito de Bellestar muestran valores superiores a 1 y en los de la zona de Garraf se obtiene un BCI claramente inferior a 1.

Estos resultados sugieren que, en los alrededores del vertedero de Can Mata, el estado de salud poblacional es equivalente (incluso ligeramente superior) al de los controles. Los animales de la zona de Bellestar, situados en una zona rural nutricionalmente propicia y de características diferentes a la de Collserola, muestran una condición corporal que responde a un acceso abundante al alimento y un estado fisiológico que permite aprovechar con ventaja esta situación, mientras que los ejemplares capturados en los alrededores del vertedero de Garraf, con unas condiciones ecológicas y nutricionales semejantes a los de la zona control, presentan valores que podrían corresponder a un estado general de salud en cierta medida deteriorado.

El estudio estadístico de los pesos, tanto el corporal como el de los órganos, reveló que los pesos corporales de los ratones de campo capturados en el DC Bellestar fueron mayores que el resto, mientras que los animales de la zona de referencia registraron un peso inferior.

En lo que se refiere a los pesos de órganos, es de señalar una marcada esplenomegalia en el caso de los animales capturados en la zona de Bellestar, así como una hepatomegalia discreta en los animales de todas las zonas comparadas con los controles.

## **Hematología**

El análisis hematológico de los animales silvestres ha sido usado frecuentemente como biomarcador para evaluar la salud de las poblaciones. Se suele usar como indicador del estado nutricional, la calidad ambiental del hábitat o si padece alguna enfermedad (Borràs et al. 1998; de Lapuente et al. 2008; Tête et al. 2015).

En el estudio comparativo entre vertederos únicamente se pudo analizar el parámetro hematológico del hematocrito. Los valores son ligeramente inferiores a los descritos en la literatura (Rogival et al. 2006; Sánchez-Chardi et al. 2008). En concreto, se observa que el valor de hematocrito del DC de Bellestar es el más afectado. El mayor tamaño de bazo e hígado en esta zona, debido a la parasitosis y a procesos inflamatorios parecen estar en consonancia con el porcentaje de células en sangre.

Los análisis hematológicos en especies centinela han sido frecuentemente utilizados como biomarcadores de salud relacionados con las alteraciones medioambientales que afectan a la calidad del hábitat (Borràs and Nadal 2004; Gorriz et al. 1996).

El número de eritrocitos, el hematocrito, la concentración de hemoglobina y los índices eritrocitarios proporcionan una medida de la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre. Las condiciones ambientales estresantes se asocian normalmente con anomalías específicas en el leucograma (Górriz-Férriz 1995; Nunes et al. 2001; Sánchez-Chardi et al. 2008).

En este estudio no se han encontrado diferencias en los valores del hematocrito entre los distintos vertederos. Sin embargo, en el estudio de distintas localizaciones en el entorno al DC de Garraf, los valores revelan una diferencia significativa del número de eritrocitos, leucocitos, linfocitos, monocitos y granulocitos de los animales capturados en el DC de Garraf respecto a los capturados a lo largo del torrente de drenaje de la balsa de lixiviados.

Aunque la leucocitosis se refiere principalmente a un sistema de defensa inmune afectado adversamente, la eosinopenia puede ocurrir cuando el organismo está sometido a fuerte estrés (Kahn 2005). La eosinofilia a menudo se produce en animales silvestres en libertad debido a la infestación parasitaria (Feldman et al. 2000). Las posibles causas de la neutrofilia relativa incluyen la inflamación, el estrés con la consiguiente respuesta de liberación de esteroides. Las bajas temperaturas ambientales que requieren una mayor tasa metabólica para la regulación de la temperatura corporal podrían ser estímulos para la eritropoyesis.

## **Histología**

La evaluación histopatológica de los tejidos diana es un biomarcador adecuado que proporciona información cualitativa y cuantitativa importante sobre los efectos agudos o

crónicos de los compuestos tóxicos, que a veces no se predice con tanta precisión por otros parámetros (Borràs and Nadal 2004; Tête, Durfort, et al. 2014).

El análisis de las observaciones histopatológicas reflejó que la zona de referencia, ubicada en Collserola, mostró cierto grado de afectación, tanto en el pulmón como en el hígado.

En el pulmón, las patologías observadas son pneumoconiosis y engrosamiento de los septos alveolares, ambas presentes en un alto porcentaje de los animales examinados. Estas patologías están prácticamente ausentes en las zonas próximas a los vertederos. La pneumoconiosis (acumulación de material particulado en los macrófagos alveolares) es generalmente debida a un alto nivel de partículas en el aire, procedentes de la combustión (industria) y de los escapes de tráfico. El engrosamiento septal se interpreta como una consecuencia del efecto irritativo de este mismo tipo de polución.

En el hígado, la condición que hace aumentar el score medio en los animales de Collserola es la acumulación de un pigmento marrón-dorado en las células de von Kupffer (también denominadas células estrelladas, macrófagos fijos del estroma hepático). Este tipo de pigmento no puede identificarse con seguridad si no se realizan tinciones específicas, pudiendo tratarse de hemosiderina (revelada por la tinción de Perls) o de lipofuscina (demostrable por la tinción de Schmorl). La experiencia de nuestro grupo en estudios anteriores, nos conduce a hipotetizar que en este caso se trata de lipofuscina (Górriz-Férriz 1995; Górriz et al. 1996; de Lapuente et al. 2008), pigmento complejo que representa el producto final de la peroxidación lipídica, y que hemos señalado con frecuencia en situaciones de contaminación atmosférica de carácter oxidativo.

La zona control se encuentra en una ladera exenta de fuentes de contaminación edáfica, pero expuesta abiertamente a los vientos procedentes de la importante zona industrial y urbana de la comarca del Vallès. Podemos aceptar, pues, que las patologías pulmonares y hepáticas encontradas en los animales control se deben a la exposición a contaminación atmosférica, que podemos distinguir cualitativamente de los posibles efectos causados por la polución edáfica en las zonas de estudio.

Por otra parte, también aparece una distinción cualitativa entre los diversos vertederos estudiados. La zona de Bellestar se caracteriza por presentar patologías de bazo y riñón, mientras que el grado de afectación hepática aparece relativamente bajo. En el bazo se observa abundante hemosiderosis en los macrófagos, condición que sería preciso matizar filtrando la observación en función del sexo, ya que la hemosiderosis se presenta de forma fisiológica en los machos. Más significativa es la presencia de apoptosis linfocitaria en los nódulos de Malpighi (starry sky), que frecuentemente está relacionada con un nivel elevado de corticoides en sangre, sugiriendo cierto grado de estrés metabólico. La observación de un número excesivo de megacariocitos se relaciona con la presencia de hematopoyesis

extramedular, una alteración poco específica, frecuentemente asociada a pequeñas pérdidas de sangre, que pueden ser debidas a parasitosis. Precisamente esta zona es la única en la que se ha reportado un nivel significativo de infestación hepática. Si bien el aumento de parasitosis puede, en ciertos casos, relacionarse con un estado de inmunodepresión debido al estrés tóxico, este punto debe ser evaluado con precaución, considerando las características ecológicas de la zona.

La zona del depósito controlado de Can Mata ha mostrado una presencia significativamente menor de patologías, comparada con todas las demás. En el caso del vertedero de Garraf, se observa un grado relativamente elevado de afectación esplénica y, en especial, unos valores altos de apoptosis y necrosis hepática, patologías frecuentemente observadas en las zonas expuestas a contaminación edáfica de origen químico (de Lapuente et al. 2008; Sánchez-Chardi et al. 2007).

### **Análisis de metales pesados**

La respuesta diferencial observada entre las zonas de estudio, señala la necesidad de una cuidadosa interpretación y consideración de los posibles escollos en el uso de los niveles de metales como biomarcador general de la exposición, teniendo en cuenta aspectos como la composición natural del suelo o la movilización de metales debido a los cambios causados por la contaminación en el pH del suelo (van den Brink et al. 2010; González et al. 2006).

Sin embargo, en ese contexto, los perfiles metálicos pueden constituir una parte importante de un proceso integrado de evaluación de riesgo ecotoxicológico, que brinda información sobre los efectos directos e indirectos de la contaminación.

Estos resultados también resaltan la utilidad y sensibilidad del ratón de bosque como especie centinela para la evaluación de la exposición y para recopilar información sobre la biodisponibilidad de los elementos analizados en diferentes condiciones de exposición (de Lapuente, Borràs, and Nadal 2004).

El análisis de metales pesados se llevó a cabo en la zona de referencia y en los depósitos controlados de Bellestar y de Can Mata. La concentración de los elementos estudiados se encontró concordancia con los valores obtenidos en estudios similares (Mertens et al. 2001; Rogival et al. 2006).

Destaca la elevada concentración de metales pesados en el hígado de los animales capturados en el DC Bellestar (Pb, Hg, Zn y Cu). Este dato implica que estos metales fueron incorporados vía ingesta y fueron biodisponibles y acumulados en el tejido diana en todas las zonas de estudio.

Talmage and Walton (1991) sugirieron que existe una relación entre las concentraciones de contaminantes del suelo o en los alimentos y las concentraciones analizadas en los tejidos diana de varias especies. Esta relación es más obvia para los metales pesados no esenciales como el cadmio, el plomo o el mercurio.

El Zn es un metal esencial que se encuentra ampliamente distribuido por la corteza terrestre. Su biodisponibilidad para la biota varía en función del rango del pH del suelo. Así, si el pH es ligeramente acidificado, como sería el caso del DC de Garraf, la fracción intercambiable es más elevada que a pH neutro. Por otro lado, en los mamíferos, al ser un elemento esencial, las cantidades encontradas en los tejidos pueden estar reguladas por mecanismos homeostáticos como parece ser en el caso de las concentraciones de Zn encontradas en el hígado y musculatura de los animales capturados en el DC de Bellestar (Mertens et al. 2001; Ullrich, Ramsey, and Helios-Rybicka 1999).

Las concentraciones de cadmio, plomo, mercurio y cobalto determinadas en hígado y musculatura resultaron ser insignificantes y en niveles similares a obtenidos en otros estudios (Sánchez-Chardi et al. 2007; Sanchez-Chardi and Nadal 2007).

La emisión de metales pesados al medio ambiente en concentraciones superiores a las deseadas suele provocar efectos tóxicos no deseados en la población de pequeños mamíferos. En los estudios con bioindicadores, establecer una correlación directa e inequívoca entre exposición y efecto, resulta una tarea no siempre fácil, puesto que las emisiones de metales pesados en el ambiente suelen venir acompañadas de la emisión conjunta de otros compuestos orgánicos igualmente dañinos, como es el caso de los lixiviados de las balsas de los depósitos controlados estudiados.

Por otro lado, la biodisponibilidad de los elementos metálicos y la dotación enzimática de la maquinaria de detoxificación de cada especie y de cada población, son específicos de cada localización (de Lapuente et al. 2014). Es por ello que, para los estudios ambientales, resulta muy complicado establecer niveles de límite de exposición para cada elemento y para cada especie.

Un factor adicional, y especialmente relevante, es el que juega la microbiota intestinal en los procesos fisiológicos de la fauna silvestre. El conjunto de comunidades bacterianas que componen dicha microbiota pueden marcar la biología del organismo huésped, la respuesta inmune o la adquisición diferencial de nutrientes de la alimentación. Estos procesos influirán sensiblemente en la respuesta fisiológica por exposición a metales pesados (Torres et al. 2004; Viney 2019).

### **Genotoxicidad (micronucleus test y comet assay)**

El test de los micronúcleos es un test utilizado actualmente en el mundo de la toxicología para detectar compuestos potencialmente genotóxicos. En su versión *in vivo*, el test es realizado en las células de la médula ósea o en eritrocitos circulantes. W. Schmid y J.A. Heddle desarrollaron independientemente las primeras pruebas *in vivo* que se conocen (Heddle 1973; Schmid 1973). Posteriormente y gracias a las nuevas tecnologías, Tometsko desarrollò un protocolo de contaje utilizando un citómetro de flujo que revolucionó la técnica, por su objetividad y el tiempo que se invertía para la obtención de resultados (Tometsko, Torous, and Dertinger 1993). Sin embargo, actualmente ambas formas de evaluación siguen siendo vigentes.

El ensayo de los micronúcleos *in vivo* en mamíferos es especialmente relevante para evaluar la genotoxicidad dado que integra factores de metabolización, cinética y reparación de ADN. El test se usa para la detección del daño producido por agentes tóxicos a nivel de cromosomas o en el aparato mitótico de los eritroblastos (OECD TG 474 2014). La prueba evalúa la formación de micronúcleos, o corpúsculos de Howell Jolly, en eritrocitos circulantes. Los micronúcleos son núcleos erráticos formados durante el anafase de la mitosis o durante la meiosis.

Dentro de las técnicas clásicas para la evaluación de la genotoxicidad se encuentran también, ensayos como el test de Ames (OECD TG 471 1997), el Mouse Lymphoma Assay (OECD TG 476 1997), el test de Aberraciones cromosómicas (Natarajan 2002; OECD TG 473 2016) o el mencionado test de los micronúcleos. Sin embargo, y cada vez más, se está consolidando entre los test de *screening* tanto a nivel *in vitro*, como a nivel *in vivo*, el test del Cometa, Comet Assay o “*Single-Cell Gel Electrophoresis*”. Este test ofrece la oportunidad de estudiar el daño del DNA, la reparación y la muerte celular en diferentes tejidos, sin la necesidad de conocer el cariotipo ni la tasa de renovación celular del tejido estudiado. Se trata, pues, de un ensayo sensible, rápido y relativamente económico que se ha implantado como biomarcador inespecífico de genotoxicidad en las evaluaciones de contaminación ambiental (Jha 2008; de Lapuente et al. 2015).

El uso de pequeños roedores como centinelas de exposición a compuestos genotóxicos es frecuente debido a que es un buen biomarcador de exposición frente a fuentes de contaminación complejas. (Borràs and Nadal 2004; Heuser et al. 2002; de Lapuente et al. 2015; Lourenço et al. 2013).

El análisis de los micronúcleos presentó valores significativamente superiores en la zona de referencia, en las zonas del DC Bellestar y del DC Garraf, mientras que la zona del vertedero de Can Mata aparece libre de efectos genotóxicos. El tipo de vertidos en las dos zonas afectadas difiere substancialmente, pero ambas clases de polución son susceptibles de

causar clastogenicidad, si tenemos en cuenta el uso de productos agro-protectores en la zona rural de La Seu d'Urgell (Bellestar).

En el estudio mediante el Comet Assay, no se han observado diferencias significativas en los porcentajes de ADN en la cola de los linfocitos circulantes entre las distintas localizaciones de estudio. En el caso del estudio específico de DC de Bellestar, los resultados son exactamente paralelos a los ya discutidos para el ensayo de Micronúcleos.

En el estudio de genotoxicidad, mediante el ensayo de micronúcleos, específico del vertedero de Garraf, aunque sin presentar valores excesivamente elevados, se observa una clara gradación creciente de los efectos, desde la localización DC de Garraf (contigua a la balsa de lixiviados) hasta la localización DC Garraf + 4Km. El hecho de los valores del número de micronúcleos incrementa a lo largo del torrente de drenaje de la basa de lixiviados parece ser explicable por la composición calcárea del terreno que permite un marcado efecto de deslizamiento rápido de las aguas que emergen torrente abajo (de Lapuente et al. 2014).

Por otro lado, el estudio del Comet assay en muestras de linfocitos circulantes de los ratones capturados en el DC de Garraf parecen estar dentro de los valores de normalidad, siendo el punto a 2 Km de la balsa el que presentó un porcentaje más elevado, siguiendo en parte la explicación anterior.

### **Bioquímica sérica**

El conocimiento de los parámetros fisiológicos, como es el caso de la bioquímica sérica, contribuye a la identificación del estado de salud del individuo y facilita el diagnóstico de procesos patológicos provocados por xenobióticos o infecciones, entre otras. Algunos enzimas plasmáticos son considerados biomarcadores de órganos alterados y los niveles en los que se encuentren proporcionan información de un daño celular.

El valores de la bioquímica sérica en el ratón de campo capturados *in situ* ha sido estudiado por el grupo de trabajo y los valores obtenidos parecen estar en los niveles observados en otros estudios (Borràs et al. 1998; Gorriz et al. 1996; de Lapuente et al. 2008).

En el estudio comparativo entre vertederos, el perfil hepático muestra valores más elevados que los del control en todas las zonas de estudio, sugiriendo un cierto grado de afectación del hígado. Sin embargo, las diferencias son muy pequeñas en el caso de Bellestar, y también muy reducidas en los animales de Can Mata. Solamente se aprecian valores significativamente elevados de los enzimas hepáticos en el caso del vertedero de Garraf, indicando la presencia probable de patologías que pueden implicar muerte celular. Estos valores sugieren que la exposición a contaminantes hepatotóxicos son claramente superiores en el DC de Garraf que en las otras zonas de estudio.

En lo que se refiere al perfil renal, también se observan valores más elevados que los de los controles en todas las zonas de estudio, aunque indicativos de una afectación leve y equivalente en los tres vertederos. Los valores sugieren que los animales de la zona de referencia pueden padecer cierto stress fisiológico por deshidratación, por falta de alimento y por estar en continua alerta, al ser una zona relativamente humanizada (Górriz-Férriz 1995; Górriz et al. 1996)

En el estudio específico del vertedero de Garraf, el perfil renal muestra valores muy poco elevados respecto del control, mientras que los enzimas hepáticos aparecen significativamente incrementados en todos los puntos de muestreo y mostrando un importante incremento de la variabilidad, con algunos datos considerablemente más altos, en concreto, en el punto DC Garraf + 4Km. Estos valores parecen estar alineados con el daño hepático observado. Por otro lado, cierto grado de parasitación también puede alterar el perfil hepático y la emisión de enzimas hepáticos al torrente sanguíneo.

### **3.5 Conclusión**

El vertedero de Garraf, que presenta en términos generales el mayor grado de afectación, está ubicado cerca de la ciudad de Barcelona, lleva más de treinta años en funcionamiento oficial y la cantidad de desechos recibidos, tanto urbanos como industriales, es mucho mayor que en los otros dos lugares estudiados. Es necesario tener en cuenta que durante muchos años de la vida de esta instalación "antigua", los requisitos de la políticas ambientales han sido mínimos, incluso nulos, y los desechos industriales no han recibido ningún tratamiento específico. Las diferencias observadas dentro del vertedero de Garraf, por otro lado, pueden explicarse de acuerdo con sus características físicas y geológicas.

En cuanto al depósito de Can Mata, su historia es muy diferente. Aunque sus inicios también fueron controvertidos, se trata de una instalación relativamente reciente (1985), con un control riguroso de los desechos (está prohibido específicamente el vertido de productos tóxicos y peligrosos). Pese a que la cantidad de residuos recibidos es bastante considerable, nuestros datos indican que los efectos tóxicos son significativamente más leves que en las otras áreas de estudio.

A diferencia de los dos casos expuestos anteriormente, el vertedero de La Seu d'Urgell tiene una actividad mucho menor, y los residuos son de origen casi exclusivamente agrícola. Nuestros resultados muestran un nivel de efectos tóxicos similares, en algunos casos ligeramente superiores, a los del DC de Garraf, pero con algunas características diferenciales, que se explicarían a partir de las características químicas diferentes de los residuos vertidos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren una diferencia significativa entre los diferentes vertederos estudiados que se correlaciona adecuadamente con sus características históricas, socio-geográficas y de gestión.

Estos resultados sugieren que el control y el tratamiento de los desechos, así como el hecho de tener instalaciones modernas y adecuadas, pueden disminuir significativamente el impacto contaminante del vertedero en las tierras circundantes. Por otro lado, los resultados también remarcan la importancia de una política ambiental adecuada y un control preciso de las instalaciones para minimizar el impacto tóxico de los Depósitos Controlados de Residuos.

Finalmente, parece razonable afirmar, visto la respuesta diferencial existente en las determinaciones realizadas, que los biomarcadores de efecto usados, así como el uso de *Apodemus sylvaticus* como centinela de contaminación de fuentes complejas, representan una buena metodología para ser utilizada en estudios medioambientales.

## **4 *Apodemus sylvaticus* como centinela de fuentes de contaminación complejas: Vertidos de lodos de depuradora.**

### **4.1 Introducción**

La problemática de la contaminación del medio ambiente es un tema ampliamente discutido y que, a menudo, genera posiciones enfrentadas. La minimización de residuos, el reciclaje, los filtros, el uso de combustibles alternativos, la revalorización y la reutilización o las incineradoras, son parte de esta polémica de gran interés por el alto grado de sensibilización social y política.

Un apartado especial debe recibir, entonces, el tratamiento de las aguas residuales y los subproductos que se generan. Las depuradoras de aguas residuales urbanas e industriales han sido, con su implantación masiva en todo el territorio, un salto cualitativo en las condiciones fisicoquímicas de las aguas de nuestros ríos. Estas instalaciones han generado unos residuos nuevos, los lodos de depuradora, donde surge la problemática de su tratamiento.

Una vez tratados y recolectados, los lodos son transportados a depósitos controlados, vertidos al mar por colectores y/o, los que presentan menos carga de xenobióticos, suelen ser utilizados como fertilizantes de campos de cultivos.

En Europa, las políticas ambientales sobre el tratamiento y destino de los lodos de depuradora dependen de cada Estado Miembro, por lo que el tratamiento y su finalidad, en Europa, es muy variada. Sin embargo, la Directiva 86/278/CEE, todavía vigente, recoge en sus Anexos IA y IB, los valores límite de concentración de ciertos metales pesados en suelos y de su utilización en agricultura (Directiva 86/278/CEE 1986).

En 2008 se publicó un documento que recogía los impactos ambientales, económicos y sociales que generaba el uso de los lodos de depuradora en la tierra. Se estima que la cantidad de lodos generados en la UE es superior a los 10 millones de toneladas (sólidos secos), de los cuales un promedio del 40% se distribuye en tierra para uso agrícola, aunque este valor varía dependiendo del estado miembro (Milieu Ltd. WRc and RPA 2008). En el caso concreto del Estado español, en 2005, se generó más de 1 tonelada de los que más de la mitad fueron usados en suelos agrícolas (MMA 2008).

Aunque en otros países de Europa y Norte América se han realizado diferentes estudios sobre acumulación de metales por fertilización de campos con lodos de depuradora, en nuestra

zona dichos estudios son escasos (Alonso et al. 2002; López-Mosquera, Moiró, and Carral 2000).

El vertido de lodos puede generar la exposición al medio de metales pesados (García-Delgado et al. 2007; Roig et al. 2012). Esta problemática se ha abordado mediante el estudio con diversos bioindicadores focalizándose en la bioacumulación de metales pesados, en plantas (Nyamangara and Mzezewa 1999; Sadovnikova et al. 1996) en microorganismos (Dahlin et al. 1997; Munn, Evans, and Chalk 2000), en artrópodos (Cole et al. 2001) o abordando un contexto algo más complejo como serían las consecuencias de la exposición sobre la cadena trófica (Bull et al. 1977). Sin embargo, un estudio como el presente, usando *Apodemus sylvaticus* como centinela de contaminación debido a la aplicación de lodos de depuradora en suelos agrícolas no se había abordado todavía.

No es una novedad, comentar que la presencia de metales pesados ha ido en aumento principalmente a causa de la actividad humana a lo largo de su historia. La entrada masiva de elementos tóxicos como el cadmio, mercurio, el plomo o el cromo hexavalente puede producir alteraciones en el medio y en las poblaciones que allí viven (Smith 2008).

A nivel humano, la exposición a metales pesados ha puesto de manifiesto que estos compuestos no escapan de provocar efectos adversos para la salud humana. Tales son casos conocidos como el síndrome de Minamata (causado por mercurio) o el saturnismo o plumbismo, (causado por el plomo), entre otros, que han ocasionado trastornos fisiológicos graves y en algunos casos incluso la muerte.

Los efectos observados por exposición a altas concentraciones de metales pesados en el medio ambiente han sido descritos ampliamente en la bibliografía. Sin embargo, establecer relaciones entre exposiciones crónicas a concentraciones subletales requiere de estudios complejos y complicados, que no siempre arrojan los resultados esperados.

Los xenobióticos y metales pesados emitidos por fuentes de contaminación complejas han sido, habitualmente monitorizados, en los compartimentos del aire y del suelo. Este destino ambiental es la vía de entrada a los organismos y con ello a la red trófica. Durante las últimas décadas, en el equipo de investigación, se ha evaluado la exposición a metales pesados de diferentes orígenes antropogénicos y el uso de centinelas o bioindicadores (Borràs et al. 1998; Brotons et al. 2011; Delgado-Sureda 2002; Górriz-Férriz 1995; Górriz et al. 1996; Sánchez-Chardi and López-Fuster 2009).

Para llevar a cabo investigaciones sobre la calidad del medio ambiente, en nuestras latitudes, además de utilizar especies autóctonas y abundantes, es necesario establecer

biomarcadores de exposición y efecto, que aporten suficiente información para poder aportar información valiosa para realizar evaluaciones del riesgo.

En el presente estudio se abordó el uso de *Apodemus sylvaticus* como centinela de contaminación de fuentes complejas asociadas al uso de lodos de depuradoras como fuente de nutrientes en suelo agrícola usando biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto. Como biomarcadores de exposición se analizaron los niveles de metales pesados y otros elementos en riñón e hígado. Los biomarcadores de efecto usados fueron: *bioquímica sérica*, analizando el perfil hepático y renal, estudio de la genotoxicidad mediante el ensayo de los micronúcleos y una evaluación microscópica de las patologías observadas en bazo, pulmón, hígado y riñón.

Las capturas de los roedores se realizaron mediante trampas de vivo Sherman en las épocas comprendidas entre enero y abril de 2002. Las zonas muestreadas fueron seleccionadas cuidadosamente con el fin de extraer el máximo de información del hábitat:

- ✓ **Zona Llots Nous:** Campos de cultivo donde se habían vertido lodos de depuradora desde 2001. Esta zona explica la aplicación reciente de lodos sin periodo de lavado.
- ✓ **Zona Llots Vells:** Campos de cultivo donde se habían vertido lodos de depuradora reiteradamente, pero que desde hacía 10 años que no se vertían. Esta zona explica la aplicación pasado de lodos de depuradora con un periodo de lavado ambiental de 10 años.
- ✓ **Zona Control Conreu:** Campos de cultivo no afectados por vertidos de lodos. Esta zona fue considerada como control de referencia de la actividad antropogénica basal en el medio.
- ✓ **Zona Control Abrera:** Área con condiciones climáticas y de vegetación muy parecidas a las anteriores, pero sin actividades antropogénicas y presumiblemente libre de contaminación. Esta zona se consideró como control negativo.

## 4.2 Material y Métodos

### Trampeo y capturas

Para capturar ejemplares de *Apodemus sylvaticus*, se utilizaron trampas de vivo, tipo Sherman. El cebo atrayente utilizado fue: harina, atún y aceite, que, mezclados, constituyen el cebo que mejores resultados nos ha dado. Las trampas fueron colocadas, antes del ocaso, a una distancia aproximada de 5 metros entre ellas. Las trampas se revisaron por la mañana del día siguiente.

Cada animal fue sexado y pesado antes de la obtención de las muestras. Los animales usados para el estudio fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

### **Análisis de metales pesados y otros elementos**

La determinación de los metales pesados y otros elementos de interés se realizó en hígado, riñón izquierdo y musculatura mediante una digestión ácida en flascos de teflón. Los tejidos fueron secados hasta peso constante a una temperatura de 60°C, durante 48 horas. La cantidad de 100 ± 25 mg de tejido seco fue digerido en 5 mL de ácido nítrico (Instra, Baker-Analysed) y 2 mL de ácido perclórico (Instra, Baker-Analysed) en flascos de teflón abiertos en un microondas Prolabo Microdigest A301 ubicado en una habitación blanca.

Las cuantificaciones de Cd, Pb, Al, Mo, Co, Hg, Zn, Cu y Cr fueron determinadas mediante un espectrómetro de masas de plasma de acoplamiento inductivo ELAN de Perkin-Elmer. - 6000 (ICP-MS), mientras que las determinaciones de Rb, Fe, Ca y Ba fueron determinadas por un espectrómetro óptico de plasma de acoplamiento inductivo Perkin-Elmer OPTIMA-3200RL (ICP-OES).

Los resultados de los niveles de metales pesados y otros elementos se expresaron como la media en µg elemento/ g de muestra (peso seco) ± SD.

### **Histología**

Durante la necropsia se extrajeron los siguientes órganos: bazo, riñón izquierdo, pulmones e hígado. Dichos órganos fueron pesados en una balanza de precisión (SCALTEC, SBA42). Se tomaron pequeñas porciones de cada órgano y se conservaron un mínimo de 7 días en formaldehído tamponado, al 10%. Posteriormente, las muestras se conservaron en etanol al 70% hasta el momento de englobarlas en moldes de parafina.

Antes de la confección de los bloques de parafinas, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación ascendente y posteriormente se les dio un baño en tolueno durante 40 minutos, para empezar con la inclusión en parafina (Paraplast Histocomp PF 55-58 °C).

Tras la inclusión en parafina, se confeccionaron los bloques de parafina. Se realizaron cortes de 5 µm con un micrótopo Leyca 2140, de cuchillas desechables, y se depositaron en agua desionizadas con gelatina, para ser capturados con portaobjetos.

La tinción se practicó en cubetas manuales mediante una modificación de la tinción clásica de Hematoxilina - Eosina con los siguientes pasos: Xileno (10 minutos) + Alcohol 96° (5 minutos) + Alcohol 70°-formol 10% (9:1) (10 minutos) + Agua destilada (5 minutos) + Hematoxilina (6 minutos) + Agua básica (pH:9)(10 minutos) + Eosina (5 minutos) + Alcohol absoluto (1 minuto) + Alcohol absoluto (5 minutos) + Alcohol absoluto (10 minutos) + Eucaliptol (10 minutos) (Comunicación personal de Miquel Borràs).

Tras la tinción se realizó el montaje con cubreobjetos y DPX, dejando secar durante 24 horas. Las preparaciones se observaron en un microscopio Nikon E400 con una cámara Leyca acoplada.

Se analizaron un mínimo de tres secciones de cada muestra. Las lesiones histológicas fueron cuantificadas según una escala convencional de 0 a 4, de acuerdo con su severidad y extensión (**Score**), siendo 0 las observaciones sin patología asociada, 1 con lesiones leves y observadas esporádicamente, 2: con alteraciones y relativa frecuencia, 3 con lesiones de observación y extensión moderada, 4: patologías ampliamente extendidas por el órgano.

Los resultados de las observaciones se tabularon por órganos y por patologías específicas de cada órgano. Multiplicando la severidad por el número de casos se obtuvo un *índice* de la patología. Los resultados se expresaron como el promedio del índice de las patologías de cada órgano. La variable Media devuelve el promedio del índice de las patologías observadas por localidad.

### **Micronucleus test**

El test de micronúcleos se llevó a cabo mediante la realización de frotis de sangre en portaobjetos previamente desengrasados. La sangre fue fijada con metanol (10 minutos) y posteriormente teñida con el colorante MayGrünwald-Giemsa (Sigma) durante 15 minutos. Tras un lavado en agua desionizada, los portaobjetos fueron conservados deshidratados a temperatura ambiente hasta la observación.

Para cada individuo se contabilizaron el número de micronúcleos observados en 2000 eritrocitos en un microscopio Nikon E-200 con un objetivo con aceite de inmersión (x100) (OECD TG 474 2014).

Los resultados se expresaron como la media de micronúcleos en cada 1000 eritrocitos.

### **Bioquímica sérica**

La sangre se recogió en tubos eppendorfs heparinizados y se conservó a 4 °C hasta la obtención del sérum; para ello se centrifugó la muestra sanguínea a 12000 r.p.m. durante 3 minutos en una centrífuga eppendorf 5415 D. El plasma obtenido se separó de la fracción celular y colocándose en cubetas SPOTCHEM® se conservó a -20 °C para su posterior lectura.

El análisis de las muestras se realizó en un equipo de análisis clínicos (SPOTCHEM®) usando tiras reactivas de cada elemento: GOT (Transaminasa Glutámico-Oxalacética, UI/L), GPT (Transaminasa Glutámico-Pirúvica, UI/L), Proteínas Totales (g/dL), Creatinina (mg/dL) y BUN (Blood Urea Nitrogen, mmol/l).

Los resultados se mostraron como la media de cada parámetro  $\pm$  SD.

### **Estadística**

La evaluación estadística se realizó usando el paquete estadístico SPSS Statistics versión 21 (IBM).

Las variables continuas se analizaron mediante la prueba de Levene, para comprobar la homocedasticidad de las varianzas. Posteriormente se aplicó el Modelo Lineal General, como estadísticos paramétricos, o el test de Kruskal-Wallis como estadístico no paramétrico.

Las diferencias entre grupos con varianza homocedásticas se obtuvieron a partir del HSD del test de Tukey, mientras que si las varianzas no eran iguales se usó el estadístico de Games Howell. En el caso de las variables no paramétricas se usó el estadístico de la U- Mann Whitney.

## **4.3 Resultados**

### **Trampeo y capturas**

En total se capturaron un total de 88 *Apodemus sylvaticus* (52/36), distribuidos por sexos entre las diferentes zonas de muestreo (Tabla 4-1): En las 4 zonas de estudio se observa un claro dimorfismo sexual, teniendo los machos un peso superior a las hembras.

Hay que remarcar que en la zona de Llots Vells se capturaron los animales como mayor peso pero que el número de individuos es bajo.

El análisis estadístico de los pesos no proporcionó diferencias entre las zonas de estudio ni entre los pesos de machos y hembras.

### **Análisis de metales pesados y otros elementos**

La determinación de metales pesados se realizó según se describe en la sección Análisis de metales pesados y otros elementos.

Los resultados obtenidos en la determinación de los metales pesados y otros elementos estudiados se resumen en las tablas: hígado: Tabla 4-2, Tabla 4-3, Tabla 4-4 y Tabla 4-5.

Tabla 4-1.- Resumen de los animales capturados en la zona de estudio.

Localidad		N	Peso	±	SD
Llots Nous	♂	11	20,63	±	4,55
	♀	11	17,64	±	4,57
	♂♀	22	19,14	±	4,71
Llots Vells	♂	5	23,72	±	3,27
	♀	2	16,11	±	4,28
	♂♀	7	21,54	±	4,89
Control Conreu	♂	20	19,57	±	5,23
	♀	11	17,88	±	3,79
	♂♀	31	18,97	±	4,77
Control Abrera	♂	16	22,72	±	4,32
	♀	12	17,92	±	4,99
	♂♀	28	20,66	±	5,14
Total	♂	52	21,16	±	4,80
	♀	36	17,72	±	4,31
	♂♀	88	19,75	±	4,89

Las comparaciones entre grupos mostraron que el contenido de Zinc en el hígado de los individuos de la zona del control de Abrera fue significativamente menor que el de la zona con vertidos antiguo y la zona del control de referencia de los campos de cultivos.

Tabla 4-2.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en el hígado

	Zn	±	SD	Cu	±	SD	Cr	±	SD
Llots Nous	91,20	±	26,90	12,87*	±	3,45	0,59	±	0,46
Llots Vells	108,74	±	25,58	16,54	±	4,87	0,78	±	0,27
Control Conreu	116,34	±	59,70	18,27	±	10,46	0,79	±	0,77
Control Abrera	84,13*	±	16,87	12,55*	±	2,45			

Unidades:  $\mu\text{g/g}$  (peso seco); \* $p < 0,05$

El contenido de Cobre en el hígado de los animales capturados en la zona de Llots Nous fue significativamente menor al compararlo con el contenido de los animales de la zona de Llots vells y los de la zona de referencia de los campos de cultivo.

No se observaron diferencias en el contenido de cromo en hígado entre las zonas de estudio. Sin embargo, se observó que el contenido medio de la concentración de cromo de los hígados de la zona Llots Nous fue un 25% inferior al resto de zonas.

Tabla 4-3.- Resumen de las determinaciones de los metales pesados estudiados en el riñón

<b>Abrera</b>	<b>Zn</b>	<b>± SD</b>	<b>Cu</b>	<b>± SD</b>	<b>Cr</b>	<b>± SD</b>
<b>Llots Nous</b>	60,79	± 15,83	12,59*	± 3,42	5,30*	± 5,00
<b>Llots Vells</b>	83,59*	± 16,98	16,18	± 2,97	0,66	± 0,46
<b>Control Conreu</b>	66,82	± 7,52	13,44	± 1,83	0,59	± 0,60
<b>Control Abrera</b>	66,53	± 7,96	11,98	± 1,31	1,38	± 1,08

Unidades:  $\mu\text{g/g}$  (peso seco); \* $p < 0,05$

La evaluación estadística no paramétrica desveló que había diferencias entre el contenido de hierro en el hígado de las localidades de captura. Las comparaciones entre zonas ratificaron que los animales capturados en la zona donde se vertieron antiguamente lodos, Llots Vells, presentaban mayor contenido que los de la zona donde el vertido había sido reciente o que los del control de Abrera.

El Bario, en el hígado, fue encontrado en menor cantidad en los animales de la zona de recientes vertidos si los comparamos con los dos Controles y la zona de Llots Vells.

Se hallaron diferencias entre las dos zonas de vertidos de lodos de depuradora, en lo que respecta al contenido de zinc en el riñón, siendo la zona de los vertidos antiguos la que tuvo un valor medio más alto. El cobre se halló, también, en mayor cantidad en la zona de vertidos viejos respecto a la zona control.

El contenido de cromo en riñón de los animales de la zona de vertidos nuevos fue muy superior al de la zona de lodos viejos o la zona del control de cultivos. Sin embargo, hay que tener en cuenta la alta variabilidad de los resultados (Figura 4-1).

Tabla 4-4.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en el hígado

	<b>Fe</b>	<b>± SD</b>	<b>Ca</b>	<b>± SD</b>	<b>Ba</b>	<b>± SD</b>
<b>Llots Nous</b>	277,06	± 99,02	114,97	± 36,95	0,10*	± 0,08
<b>Llots Vells</b>	572,66*	± 236,18	216,24	± 226,51	0,51	± 0,83
<b>Control Conreu</b>	458,89	± 271,31	141,55	± 48,14	0,52	± 0,62
<b>Control Abrera</b>	315,96	± 127,89	124,37	± 98,66	0,19	± 0,08

Unidades:  $\mu\text{g/g}$  (peso seco); \* $p < 0,05$

No se han encontrado diferencias entre las cantidades de calcio, ni de bario, de los riñones analizados. Sin embargo, sí que se observan diferencias en el contenido de hierro, siendo la zona de Llots Nous la que presenta una menor cantidad de hierro respecto a la zona de vertidos antiguos o la zona Control.

Tabla 4-5.- Resumen de las determinaciones de los elementos estudiados en el riñón

Abrera	Fe	± SD	Ca	± SD	Ba	± SD
Llots Nous	178,53*	± 100,13	183,14	± 55,07	0,21	± 0,29
Llots Vells	335,09	± 76,63	282,44	± 154,66	0,37	± 0,50
Control Conreu	245,16	± 89,98	202,01	± 32,62	0,61	± 1,00
Control Abrera	273,81	± 81,64	201,51	± 44,76	0,61	± 0,67

Unidades:  $\mu\text{g/g}$  (peso seco); \* $p < 0,05$

La zona de Llots Vells presentó una variabilidad muy elevada con respecto a las otras zonas de captura. Este tipo de resultados es habitual en zonas donde hay una contaminación difusa no letal pero sí con efectos visibles. Sin embargo, el número de individuos es bajo para poder confirmar alguna sentencia y por otro lado, como es habitual, la variabilidad es muy elevada.

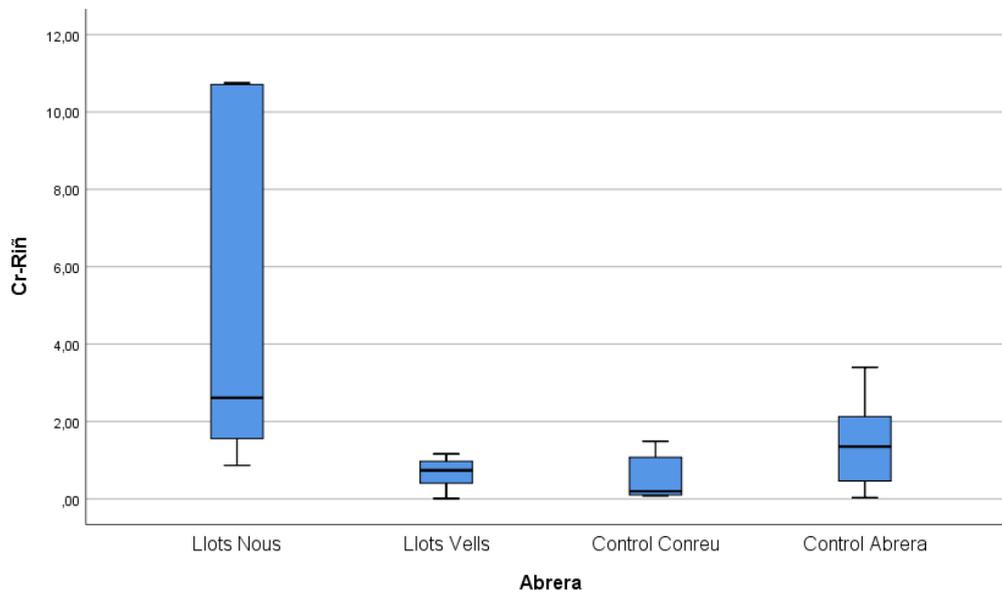


Figura 4-1.- Diagrama de cajas sobre el contenido de cromo total en el riñón.

### **Histología**

El estudio histológico de los órganos de los individuos capturados se centró en el bazo, riñón, pulmón e hígado. Las valoraciones medias de las patologías observadas se han resumido en la Figura 4-2.

Se realizó una visión general de los cortes histológicos para determinar patologías relevantes de cada órgano. En algunos casos, el bazo presentó dimensiones de mayor medida, estos casos son conocidos con el nombre de *esplenomegalia*.

Las patologías relevantes encontradas por órgano se detallan a continuación:

- Bazo: Hemosiderosis, Esplenomegalia (observación macroscópica), Apoptosis linfocitaria (Starry-sky) y Megacariocitos
- Riñón: Almacenamiento Gutular Hialino y Nefritis intersticial
- Pulmón: Pneumoconiosis, Engrosamiento de los septos lobulillares, Tejido linfático peribronquial y Congestión
- Hígado: Necrosis, Apoptosis, Depósitos de lipofuscina en células de von Kuppfer y presencia de parásitos hepáticos

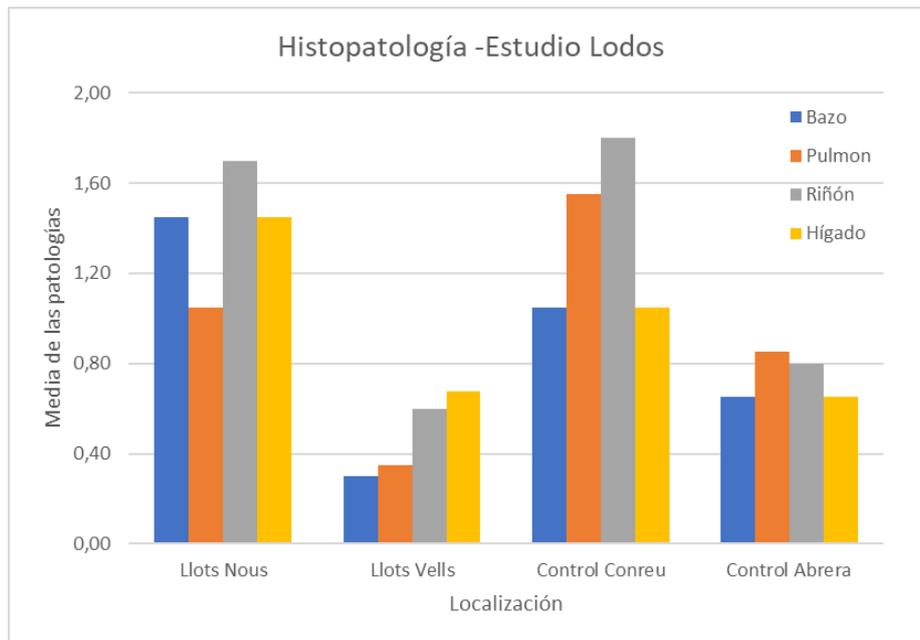


Figura 4-2.- Histograma de la media de las patologías observadas por zona de estudio

Los resultados obtenidos muestran que la zona de Llots Nous presenta un mayor índice de patologías en el bazo respecto al resto de localidades. Por el contrario, las patologías encontradas en el riñón del Control de Abrera presentan una incidencia inferior al resto. Los porcentajes de incidencia de las patologías encontradas en los pulmones presentan valores similares entre la zona de Llots Nous y el Control Conreu y a su vez éstos son sustancialmente mayores que las otras dos zonas estudiadas. Finalmente, los porcentajes de patologías observados en el hígado en Llots vells y en los dos controles son similares, siendo inferiores a los observados en la zona Llots Nous.

Figura 4-3.- Detalle de las patologías observadas en los individuos capturados en la zona Llots nous. A: hemosiderosis; B: megacariocitos.

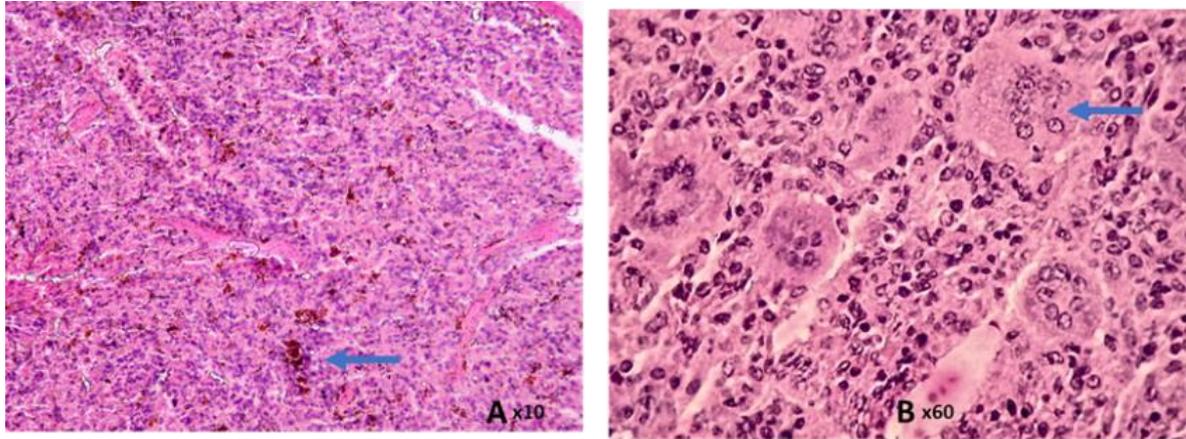
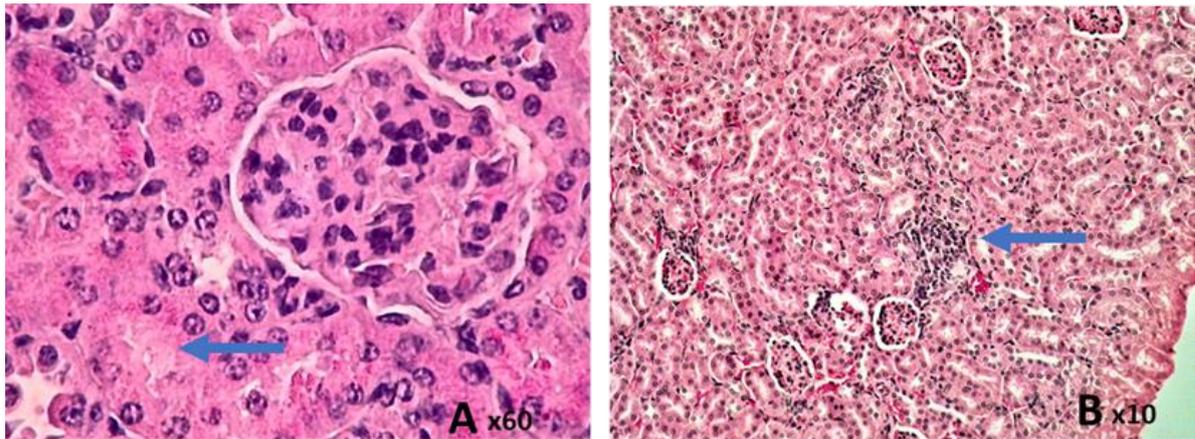


Figura 4-4.- Detalle de las patologías observadas en el riñón de *Apodemus sylvaticus*. A: Almacenamiento gutular hialino; B: Nefritis



### **Micronucleus test**

Se realizó una observación microscópica de un frotis de sangre y se registró el número de corpúsculos micronúcleos Tabla 4-6.

Se contabilizaron una media de 2000 eritrocitos y se calculó el número de micronúcleos por cada 1000 eritrocitos de los individuos capturados en las 4 localidades de estudios. La comparación de los micronúcleos observados mostró que existían diferencias entre las localidades de captura.

Tabla 4-6.- Resumen de casos de los Micronúcleos observados por cada 1000 eritrocitos.

Abrera	MN/1000 ± SD
Llots Nous	6,60* ± 2,82
Llots Vells	3,70 ± 1,03
Control Conreu	3,49 ± 2,69
Control Abrera	3,52 ± 1,39

\*  $p < 0,01$

### Bioquímica Sérica

Se realizaron determinaciones séricas de las proteínas circulantes totales, del perfil hepático (GPT y GOT) y del perfil renal (creatinina) (Tabla 4-7).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en las determinaciones bioquímicas reveló que no había diferencias en la cantidad de proteínas totales circulantes ni en la cantidad de GOT. Sin embargo, se encontraron evidentes diferencias entre las localidades de captura en lo que respecta a GPT. Los resultados de GPT obtenidos en la zona de vertidos antiguos fue claramente muy superior al resto de localidades. En cuanto a la creatinina, la estadística reveló diferencias entre las dos zonas control, pero no entre las otras zonas de estudio.

Tabla 4-7.- Resumen de determinaciones séricas realizadas en las localidades de captura.

Abrera	PT ± SD	GPT ± SD	GOT ± SD	Cr ± SD
Llots Nous	6,56 ± 0,55	69,35 ± 54,84	55,68 ± 48,62	0,75 ± 0,15
Llots Vells	6,72 ± 0,81	211,25* ± 23,74	41,00 ± 23,45	0,64 ± 0,18
Control Conreu	6,72 ± 0,56	57,67 ± 44,30	78,64 ± 67,86	0,67 ± 0,24
Control Abrera	6,61 ± 0,86	59,96 ± 42,76	58,77 ± 38,87	0,82* ± 0,12

PT (Proteínas Totales; g/dL), GOT (UI/L), GPT (UI/L), Cr: Creatinina (mg/dL); \*  $p < 0,05$

## 4.4 Discusión

### Trampeo y capturas

El ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) es un roedor ampliamente distribuido por Europa con alimentación omnívora lo que facilita su adaptación a varios hábitats. Es usado, en Europa, como bioindicador en evaluaciones del riesgo regulatorias de pesticidas (EFSA 2009).

La distribución espacial de las poblaciones del ratón de campo depende de diversos factores, como la facilidad para obtener alimento, el tipo de alimento, la estación del año, el estado fisiológico o la presión depredadora entre otras. Esta variabilidad condicionará sensiblemente la microbiota intestinal del ratón de campo y por tanto marcará, en parte, las condiciones y

concentraciones a las que se expondrá sistémicamente a los xenobióticos (Kreisinger et al. 2015; Maurice et al. 2015; Torres et al. 2004).

La exposición de la fauna silvestre a pesticidas presentes en los suelos agrícolas es, a menudo, una tarea difícil de modelizar (Liu et al. 2013).

La zona de Llots Vells presentó una presión sobre la población de *Apodemus sylvaticus*, a priori desconocida, que provocó un esfuerzo de captura superior al del resto de zonas de estudio. Dadas las características del terreno, similares a las del resto, los datos de captura sugieren un stress sobre la población de ratones de campo que parece estar relacionado con la presencia de xenobióticos en el hábitat.

### **Análisis de metales pesados y otros elementos**

El análisis del contenido de metales y otros elementos en los órganos de estudio requieren una cuidadosa interpretación. Factores como las diferencias intra e inter-poblaciones de los metales esenciales o no esenciales y la homeostasis del organismo pueden provocar diferencias relevantes. Por otro lado, el número de individuos no siempre resulta suficiente para poder establecer diferencias entre las poblaciones de estudio (González et al. 2006).

Los resultados del presente estudio revelaron diferencias entre las concentraciones de estos metales según la zona de captura, siendo la zona de Llots Vells (lodos vertidos con anterioridad) la que presentaba, habitualmente, mayor acúmulo, aunque presenta una variabilidad muy elevada con respecto a las otras zonas de captura. Este tipo de resultados es habitual en zonas donde hay una contaminación difusa no letal pero sí con efectos visibles. Dado el bajo número de individuos analizados en algunas zonas, sería comprometido emitir alguna conclusión.

En el caso especial del cromo analizado en el riñón, las concentraciones mayores se encontraron en los individuos capturados en el área de Llots Nous (lodos de aplicación reciente), y en una proporción muy significativa, lo que sugiere una relación directa con los vertidos, aunque sin descartar la posibilidad de una diferencia respecto a la biodisponibilidad, relacionada con las características fisicoquímicas del elemento y las condiciones edáficas de cada zona de captura.

La concentración de los elementos estudiados se encontró en concordancia con los valores obtenidos en estudios similares (Mertens et al. 2001; Rogival, Scheirs, and Blust 2007).

Existe una relación lineal entre los niveles de metales pesados y otros elementos existentes en el suelo y en las semillas, tejidos vegetales y gusanos, como fuente de alimentación de *Apodemus sylvaticus*. Por otro parte, se muestran evidencias de que existe una transferencia

entre el contenido de metales en la alimentación de los mamíferos y el contenido encontrado en hígado y riñón. (Kennette et al. 2002; Rogival et al. 2007). Esta relación es más obvia para los metales pesados no esenciales como el cadmio, el plomo o el mercurio (Talmage and Walton 1991)

El Zinc es un metal esencial cuya biodisponibilidad depende en parte del pH del suelo. Una vez en el organismo, el control homeostático de este elemento por los mamíferos o la exposición a otros metales, como el Cd, provocan incrementos relevantes de Zn y metaloproteínas en el organismo (Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2001). Estas evidencias podrían dar explicación a las diferencias encontradas en el contenido de Zinc de las zonas de Llots Vells y el control de referencia de los cultivos.

Las concentraciones de Calcio están fuertemente reguladas por la fisiología de los mamíferos, mientras que las concentraciones encontradas de Bario, aunque no estén a niveles tóxicos, revela la presencia del elemento en el entorno, asociado seguramente al uso de sales de bario como pesticida.

La emisión de metales pesados al medio suele provocar efectos adversos en la biota del entorno. Los estudios con centinelas de contaminación pueden suponer una señal de alarma temprana que aporte evidencias relevantes. Sin embargo, dado que la biodisponibilidad de los elementos depende, en parte, de las características fisicoquímicas del terreno y el efecto depende de los mecanismos de detoxificación de cada especie, resulta difícil, a menudo, establecer límites específicos de estos elementos en cada pieza del ecosistema.

Como se comentó en el capítulo anterior, los resultados resaltan la utilidad y sensibilidad del ratón de campo como especie centinela de fuentes de contaminación complejas para la evaluación ambiental y permitiendo recopilar, a través de ellos, información relevante sobre la exposición a metales pesados y otros elementos.

### **Histología**

En términos generales, el estudio histológico demuestra una incidencia claramente mayor de patologías en las zonas sometidas a cultivo, bien sea utilizando lodos de depuradora (Llots Nous) o recurriendo a otras formas de abono (Control Conreu), si las comparamos con las no cultivadas, tanto si se trata de tierra abonada previamente con lodos pero dejando posteriormente un período de varios años de lavado ambiental (Llots Vells) o de un terreno que no ha sido previamente abonado (Control Abrera).

La zona Llots Nous es la que presenta una incidencia superior de patologías esplénicas y hepáticas, mientras que las lesiones renales son equivalentes en ambas zonas cultivadas. Los pulmones aparecen más afectados en la zona Control Conreu (aunque la diferencia

radica únicamente en la presencia de congestión de las luces vasculares en los animales de esta localidad).

En conjunto, pues, los resultados indican que los productos agrotécnicos afectan negativamente la salud de los ratones de campo, especialmente en lo que se refiere a las patologías esplénicas, renales y hepáticas, y que estos efectos, al menos en el caso de los lodos de depuradora, resultan ser reversibles tras un período de algunos años de carencia. Estos resultados están en consonancia con estudios con roedores silvestres y la exposición a xenobióticos de uso agrícola (Dell’Omo et al. 2003; da Silva Júnior, Eslava-Martins, AL Muccillo-Baisch, et al. 2017).

### **Micronucleus test**

Las poblaciones de roedores silvestres han sido utilizadas frecuentemente como bioindicadores de daño genotóxico provocado por xenobióticos emitidos al medio ambiente (Sheffield et al. 2001). Nuestros resultados del test de los Micronúcleos se hallan dentro de los límites de la normalidad en las dos localizaciones control y también en la zona Llots Vells. Sin embargo, los ratones capturados en la localización Llots Nous presentan valores equivalentes a aproximadamente el doble de los de los controles. Estos resultados indican un efecto genotóxico en esta zona de estudio, que puede relacionarse con los elevados valores de cromo encontrados en la misma. Estos valores confirman que determinados xenobióticos ambientales inducen daños clastogénicos en el material genético del ratón de campo (Lourenço et al. 2013; Sánchez-Chardi et al. 2007).

### **Bioquímica Sérica**

Los resultados de la determinación de enzimas en el sérum como bioindicador temprano de un daño clínico, estuvieron dentro de los límites encontrados en otros estudios similares (de Lapuente et al. 2008; Sanchez-Chardi and Nadal 2007).

Los bajos valores de creatinina encontrados en sangre muestran que la función renal no parece afectada por la exposición a lodos de depuradora, sin embargo, la estadística reveló diferencias entre las dos zonas control, pero no con las otras zonas de estudio, lo que sugiere la presencia de otro tipo de contaminación que no ha sido abordada.

Por otro lado, el perfil hepático, caracterizado por los niveles plasmáticos de transaminasas y proteínas totales circulantes, muestra, a su vez, una baja afectación hepática. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre las localidades de captura en lo que respecta a GPT. Los valores de GPT obtenidos en la zona de vertidos antiguos fueron claramente superiores al resto de localidades. Estas diferencias, la alta variabilidad de los valores

obtenidos y el escaso número de individuos hace pensar en la presencia de agentes estresantes que tampoco han sido abordados en este capítulo.

## 4.5 Conclusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Los bioindicadores de exposición usados en el presente estudio (genotoxicidad, bioquímica sérica e histología) son métodos adecuados para evaluar el daño provocado por los xenobióticos existentes en el medio ambiente.
- La emisión de lodos de depuradoras en suelos agrícolas actúa de forma diferente dependiendo del tiempo desde su vertido, sin embargo, en este tipo de estudios se deberían considerar otras fuentes de contaminación como la presencia de pesticidas.
- Las variaciones intraespecíficas de la población, la homeostasis de los roedores y las características del suelo hacen que se deba tener precaución a la hora de interpretar los niveles de los metales pesados encontrados en los órganos de estudio.
- El ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, presenta suficiente entidad como para ser considerado centinela de contaminación de fuentes complejas de diferentes orígenes pudiendo integrar información tanto en el espacio como en el tiempo.

## 5 Estudio comparativo entre dos especies: *Apodemus sylvaticus* y *Mus musculus domesticus* tras la administración de un tóxico hidrofílico (dicromato potásico) y un tóxico lipofílico (tricloroetileno)

### 5.1 Introducción

La evaluación del riesgo ambiental implica por una parte la determinación y caracterización del peligro de los xenobióticos en estudio y por la otra parte a cuantificación a la que los organismos están expuestos. Sin embargo, el uso de determinados modelos, generalmente animales de laboratorio, evidencia una carencia en una comprensión global y no tiene en cuenta los efectos sobre la abundancia, la distribución y estructura de una población, así como la capacidad de recuperarse de las alteraciones (Habert, Livera, and Rouiller-Fabre 2014).

Ciertamente, los modelos de evaluación regulatoria presentan un abordaje armonizado que intenta asumir el peor caso realista. Tanto la caracterización del peligro como la evaluación de la exposición implican, no obstante, la asunción de ciertas premisas y, consecuentemente, de las incertidumbres asociadas que hacen de éstos, una práctica a menudo poco realista e insatisfactoria (Forbes, Calow, and Sibly 2008; Schmolke et al. 2010).

Llegados a este punto la pregunta que nos hacemos es si realmente es necesario estudiar las especies en su medio natural o si quizás, el estudio de un sistema experimental en condiciones controladas aporta conclusiones similares.

Para abordar esta hipótesis se plantearon dos escenarios similares, escogiendo a *Apodemus sylvaticus* como especie silvestre y a *Mus musculus domesticus* como especie controlada, se les expuso a dos tóxicos con características diferentes: un tóxico hidrofílico (dicromato potásico) y un tóxico lipofílico (tricloroetileno).

#### **Dicromato potásico**

El cromo es un metal pesado de origen natural que se encuentra de manera natural en el medio ambiente en dos valencias: cromo (III) trivalente y cromo (VI) hexavalente.

El dicromato potásico es una sustancia que se fabrica o importa en el Espacio Económico Europeo en el rango de las 100 - 1 000 toneladas por año. Es una sustancia utilizada por profesionales, con un uso generalizado en procesos de formulación o reenvasado, en áreas industriales o de fabricación. Su uso a nivel no profesional no está contemplado, ni registrado en la Agencia Europea de sustancias y mezclas químicas (ECHA).

El dicromato de potasio se utiliza en galvanotecnia para cromar otros metales, en la fabricación del cuero, en la fabricación de pigmentos, como reactivo en la industria química, para recubrimientos anticorrosivos de cinc y de magnesio y en algunos preparados de

protección de madera. Como resultado de su uso es un conocido contaminante ambiental (Norseth 1981; Rocha et al. 2015).

Las descripción y caracterización de las propiedades fisicoquímicas del dicromato potásico se detallan en las Tabla 5-1 y Tabla 5-2. La clasificación armonizada del Dicromato potásico, de acuerdo con la parte 3 del Anexo VI, Tabla 3.1 del Reglamento (CE) No 1272/2008 (Reglamento (CE) No 1272/2008 2008), se detalla en la Tabla 5-3.

Tabla 5-1.- Caracterización del Dicromato potásico

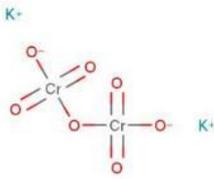
<b>Nombre químico</b>	Dicromato potásico
<b>Número EC</b>	2321-906-6
<b>Número CAS</b>	7778-50-9
<b>Nombre IUPAC</b>	Dicromato potásico
<b>Formula molecular (CAS)</b>	Cr <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 2H
<b>Formula estructural</b>	
<b>Peso molecular</b>	294,185 g/mol
<b>Impurezas</b>	0.28% dicromato de sodio

Tabla 5-2.- Resumen de las propiedades fisicoquímicas del Dicromato potásico

Propiedad	Valor	unidad
<b>Estado</b>	Sólido, cristales triclinicos de color rojo anaranjado.	@20°C y 101.3 kPa
<b>Punto de fusión</b>	398	°C
<b>Punto ebullición</b>	≈500	°C
<b>Densidad relativa</b>	2.676	@ 18°C
<b>Solubilidad en agua</b>	45	g/L @ 20°C

La caracterización de la disposición de un compuesto, desde su exposición/liberación en el organismo, hasta que se aprecian los efectos tóxicos viene determinada por el acrónimo ADME (**A**bsorción, **D**istribución, **M**etabolización y **E**xcreción).

Los datos disponibles en la ECHA indican que el dicromato potásico presenta una absorción pobre, entre un 2 y un 9 % en humanos, a nivel oral, y entre un 1 y un 4% a nivel dérmico, en cobayas. Sin embargo, su absorción se incrementa al cambiar la ruta, siendo entre el 20-30% en exposiciones inhalatorias. La absorción gastrointestinal resulta limitada debido, en parte, a la reducción del Cromo (VI) al Cromo (III) (ECHA 2019a).

Una vez absorbido el dicromato potásico, sistémicamente se comporta de manera similar a otros compuestos que contienen cromo (VI), ya que el efecto viene producido por el Cromo. Tras la exposición inhalatoria, es Cr (VI) se distribuye bien, aunque tiende a acumularse en el pulmón, el duodeno, el riñón, el hígado, en los glóbulos rojos y en el bazo, dado que tiene

afinidad por la hemoglobina. Una vez en el torrente sanguíneo, el Cr (VI) es absorbido por los eritrocitos mediante un transportador específico. Sin embargo, la reducción extracelular a Cr (III) en el plasma reduce la tasa de incorporación en las células. En estudios de exposición a cromo, con animales de experimentación, se ha observado que los niveles de cromo disminuyen gradualmente en la mayoría de los tejidos desde el primer día post-exposición. No obstante, el contenido en el bazo muestra un incremento dependiente del tiempo debido a la depuración de los eritrocitos senescentes cargados de cromo.

Se ha observado que, tras la administración parenteral en hembras gestantes de rata y ratón, los compuestos con Cr atraviesan la placenta y se distribuyen por el embrión. No se tienen datos de una excreción potencial por vía leche materna.

El Cr (VI) se reduce a Cr (III) en el tracto gastrointestinal, lo que limita notablemente su biodisponibilidad. Estudios *in vitro* han demostrado que esta reducción es promovida por la saliva humana y el jugo gástrico. El Cr (III) no se absorbe bien en el tracto gastrointestinal. El Cr (VI) puede ser incorporado y transportado por el torrente sanguíneo, sin embargo, se reducirá rápidamente a Cr (III) mediada por la Glutación (GSH). Otras moléculas endógenas, como el ascorbato y el citocromo P450 también parecen reducir el Cr (VI) a Cr (III). En el torrente sanguíneo, el Cr (VI) absorbido se reduce rápidamente a Cr (III). La reducción de Cr (VI) mediada por glutación en los eritrocitos, da como resultado una unión irreversible a la hemoglobina durante la vida útil de la célula (Bose, Moghaddas, and Li 2004; Connett and Wetterhahn 1985; O'Brien and Ozolins 1989).

El cromo se elimina rápidamente del plasma y se excreta vía orina y bilis, pero puede permanecer en los eritrocitos durante varias semanas. El Cr (VI) inhalado o instilado intratraquealmente se excreta por la orina y por las heces en cantidades similares (del 20 al 70% de la dosis administrada). Cuando la administración es por vía oral, la mayor parte de la dosis aparece en las heces, debido a la mala absorción en el tracto gastrointestinal. El cromo excretado por la orina o por las heces se encuentra en forma de compuestos de Cr (III), típicamente con glutación.

La evaluación del riesgo realizada por la Unión Europea resume los resultados de varios estudios *in vitro* de diversas fuentes y confiabilidad. En esta evaluación se concluye que los compuestos de Cr (VI) solubles en agua son genotóxicos *in vitro* (EU RAR 2005).

El cromo está clasificado como carcinógeno del Grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC 2012). En 2010, los estados miembros firmaron un acuerdo en el que identifican al dicromato potásico como sustancia de alta preocupación de acuerdo con el artículo 57 y 59 del Reglamento (EC) 1907/2006 (Reglamento (CE) No 1907/2006 2006).

Tabla 5-3.- Clasificación armonizada del Dicromato potásico según el Reglamento 1272/2008.

<b>Código del peligro</b>	<b>Clase de peligro y código de la categoría</b>	<b>Clase de peligro</b>
H272	Ox. Sol. 2	Sólido comburente; Puede intensificar el fuego; oxidante
H301	Acute Tox. 3*	Tóxico por ingestión
H312	Acute Tox. 4 *	Nocivo en contacto con la piel
H314	Skin Corr. 1B	Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares
H317	Skin Sens. 1	Puede provocar una reacción alérgica en la piel
H330	Acute Tox. 2 *	Fatal si se inhala
H334	Resp. Sens. 1	Puede causar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias si se inhala
H335	STOT SE 3; H335: C ≥ 5 %	Puede irritar las vías respiratorias.
H340	Muta. 1B	Puede causar defectos genéticos.
H350	Carc. 1B	Puede causar cáncer.
H360-FD	Repr. 1B	Toxico para la reproducción: fertilidad y desarrollo
H372**	STOT RE-2	Provoca daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas.
H400	Aquatic Acute 1	Muy tóxico para la vida acuática.
H410	Aquatic Chronic 1	Muy tóxico para la vida acuática con efectos de larga duración

## **Tricloroetileno**

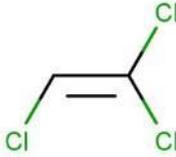
El tricloroetileno (TCE) es una sustancia que en su estado natural es líquida e incolora. Se usa como solvente para limpiar y desengrasar partes metálicas. No obstante, ha tenido otros usos, como anestesia, medio de transferencia de calor, agente de extracción de grasas y aceites, como intermediario en la producción de clorofluorocarburos y otros productos químicos, y como ingrediente en muchos productos para uso industrial y uso doméstico (Doherty 2000).

Actualmente, el tricloroetileno es una sustancia que se fabrica o importa en el Espacio Económico Europeo en el rango de las 10000 - 100000 toneladas por año. Es una sustancia utilizada por profesionales, como desengrasante y como intermediario para sintetizar otros químicos en áreas industriales o de fabricación. Su uso a nivel no profesional no está contemplado, ni registrado en la Agencia Europea de sustancias y mezclas químicas (ECHA 2019b).

La exposición laboral al tricloroetileno está disminuyendo en los países industrializados debido a la innovación tecnológica y la legislación (Von Grote et al. 2003).

Las descripción y caracterización de las propiedades fisicoquímicas del tricloroetileno se detallan en las Tabla 5-4 y Tabla 5-5

Tabla 5-4.- Caracterización del Tricloroetileno

<b>Nombre químico</b>	Tricloroetileno
<b>Número EC</b>	201-167-4
<b>Número CAS</b>	79-01-6
<b>Nombre IUPAC</b>	Trichloroethylene
<b>Formula molecular (CAS)</b>	$C_2HCl_3$
<b>Formula estructural</b>	
<b>Peso molecular</b>	131,4 g/mol

No se cree que el tricloroetileno se produzca de forma natural en el medio ambiente. Sin embargo, se ha encontrado en fuentes de agua subterránea y en muchas aguas superficiales como resultado de la fabricación, el uso y la eliminación del producto químico al medio ambiente (Abrahamsson et al. 1995).

Tabla 5-5.- Resumen de las propiedades fisicoquímicas del tricloroetileno

Propiedad	Valor	Unidad
Estado	Líquido	@20°C y 101.3 kPa
Punto de fusión	-84,9	°C
Punto ebullición	86,55	°C
Densidad relativa	1,465	@ 20°C
Solubilidad en agua	1,1	g/L @ 20°C
Presión de Vapor	99 hPa	@ 24.85 °C
Log Kow	2,53	@ 20 °C

Al ser una sustancia inorgánica no se han obtenido valores de presión de vapor o del coeficiente de partición octano-agua entre otros.

Su clasificación armonizada de acuerdo con la parte 3 del Anexo VI, Tabla 3.1 del Reglamento (CE) No 1272/2008 se detalla en la Tabla 5-6

Estudios en animales experimentales y en humanos han demostrado que el tricloroetileno se absorbe rápida y ampliamente por todas las vías de exposición. En estudios de absorción por inhalación, se muestran valores medios de retención pulmonar que varían del 35% al 70% en humanos, dependiendo de la actividad física. Se ha observado que tras la absorción pulmonar se alcanza un estado estacionario sistémico pocas horas después del inicio de la exposición. En exposiciones orales se ha observado que es una ruta de absorción rápida y que el 98% de la dosis administrada se excreta por la orina mientras que entre el 1% y el 4% se elimina por el aire exhalado (Prout, Provan, and Green 1985).

Tabla 5-6.- Clasificación armonizada del tricloroetileno según el Reglamento 1272/2008.

Código del peligro	Clase de peligro y código de la categoría	Clase de peligro
H315	Skin Irrit. 2	Provoca irritación cutánea
H319	Eye Irrit. 2	Provoca irritación ocular grave
H336*	STOT SE 3	Puede provocar somnolencia o vértigo
H341	Muta. 2	Se sospecha que provoca defectos genéticos.
H350	Carc. 1B	Puede causar cáncer.
H412	Aquatic Chronic 3	Nocivos para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos

Una vez absorbido, el tricloroetileno entra en el torrente sanguíneo y experimenta una rápida distribución sistémica por los tejidos. Debido a su lipofilicidad, el tricloroetileno presenta preferencia por los tejidos con un alto contenido de lípidos, como la grasa. Resultados de los ensayos con ratas y ratones expuestos a tricloroetileno por vía oral o por inhalación sugieren que la sustancia se distribuye en el riñón, el hígado, el pulmón, la grasa, los músculos, el tracto gastrointestinal, el corazón y el bazo.

En poblaciones humanas expuestas ambientalmente a tricloroetileno, se ha detectado la sustancia en el hígado, el cerebro, el riñón y el tejido adiposo, y también en la leche materna. Se ha demostrado que el tricloroetileno atraviesa la placenta humana (IARC 2014)

Aunque el tricloroetileno se divide preferentemente en tejidos ricos en grasa, no hay evidencia de una retención prolongada.

El tricloroetileno se elimina predominantemente del cuerpo por el metabolismo, lo que representa entre el 50 y el 99% de la dosis absorbida.

Los estudios en humanos y una variedad de especies animales experimentales sugieren que las vías metabólicas son comunes a todas las especies. La principal ruta metabólica en todas las especies implica la conversión inicial de tricloroetileno en un epóxido transitorio por el citocromo P450. Este epóxido sufre un reordenamiento intramolecular para formar tricloroacetaldehído, que a su vez se hidroliza para formar hidrato de cloral. El hidrato de cloral actúa entonces, como un sustrato para el enzima alcohol deshidrogenasa y la hidrato de cloro deshidrogenasa para producir tricloroetanol y ácido tricloroacético, respectivamente. Se ha identificado, también, una segunda vía cuantitativamente menor, que involucra la conjugación con glutatión, en ratas, ratones y humanos.

Aunque todas las especies comparten vías metabólicas comunes, se han identificado diferencias entre especies y cepas en la saturabilidad del metabolismo del tricloroetileno. Esto ha sido investigado más a fondo en ratas y ratones.

Las vías de eliminación para el tricloroetileno son las mismas en humanos y animales y no hay evidencia de que la vía de exposición influya en la vía de eliminación. La mayoría del tricloroetileno no metabolizado se exhala. Los metabolitos del tricloroetileno se eliminan predominantemente en la orina con una pequeña proporción eliminada en la bilis y las heces.

En estudios con animales de experimentación se ha observado que el metabolismo oxidativo del tricloroetileno es catalizado por las enzimas del citocromo P450 y la conjugación con GSH del tricloroetileno es catalizada por las enzimas GST. Por otro lado, se ha observado, tanto en animales de experimentación como en ensayos *in vitro*, la formación de metabolitos reactivos de tricloroetileno a partir del procesamiento de metabolitos de conjugación de GSH en el riñón. Se ha comprobado que dichos metabolitos son genotóxicos (ECHA 2019b; IARC 2014).

El tricloroetileno está clasificado como carcinógeno del Grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC 2014). En 2010, los estados miembros firmaron un acuerdo en el que identifican al tricloroetileno como sustancia de alta preocupación de acuerdo con el artículo 56 del Reglamento (EC) 1907/2006 (Reglamento (CE) No 1907/2006 2006).

## 5.2 Material y Métodos

### Sistema experimental

Durante el estudio con el tóxico polar, se proporcionó a 12 *Apodemus sylvaticus* (6/6) y a 12 *Mus musculus domesticus* (6/6) agua *ad libitum*, con una concentración de 0.085 g/L de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), lo que corresponde a una dosis aproximada de 25.5 mg dicromato potásico/ Kg bw/ día [9,01 mg Cr(VI)] (aproximadamente 1/6 de la  $DL_{50}$ ), durante 28 días, mientras que los animales del grupo control bebieron agua sin tratamiento .

Durante el estudio con el tóxico lipofílico, se proporcionó a 12 *Apodemus sylvaticus* (6/6) y a 12 *Mus musculus domesticus* (6/6) agua *ad libitum*, con una concentración de 99 g Tricloroetileno ( $C_2HCl_3$ )/L, lo que corresponde a una dosis aproximada de 400 mg/Kg bw/día (aproximadamente 1/6 de la  $DL_{50}$ ), durante 28 días durante 28 días, mientras que los animales del grupo control bebieron agua sin tratamiento.

Cada animal fue sexado, y pesado al inicio y al final del ensayo.

### Bioquímica sérica

La sangre se recogió en tubos eppendorfs heparinizados y se conservó a 4 °C hasta la obtención del suero. Para ello se centrifugó la muestra sanguínea a 12000 r.p.m. durante 3 minutos en una centrífuga eppendorf 5415 D. El plasma obtenido se separó de la fracción celular y colocándose en cubetas SPOTCHEM® se conservó a -20 °C para su posterior lectura.

El análisis de las muestras se realizó en un equipo de análisis clínicos (SPOTCHEM®) usando tiras reactivas de cada elemento: GOT (Transaminasa Glutámico-Oxalacética, UI/L), GPT (Transaminasa Glutámico-Pirúvica, UI/L), Proteínas Totales (g/dL), Creatinina (mg/dL) y BUN (Blood Urea Nitrogen, mmol/l).

Los resultados se mostraron como la media de cada parámetro  $\pm$  SD.

### Comet assay

El Comet assay evalúa el daño genético mediante la observación del porcentaje de DNA en la cola de los linfocitos circulantes.(Collins 2004; Fairbairn et al. 1995). Para ello se incluyeron 18  $\mu$ L de sangre completa en agarosa (LMP-Gibco) al 0,6% preparada en agua MilliQ y se colocó una fina capa en portaobjetos comerciales previamente recubiertos (Trevigen®). Los portaobjetos se colocaron en tampón de lisis (NaCl 2,5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, N-lauril-sarcosin al 1% (p / v) con Triton X-100 al 1% durante 1 hora a 4 ° C. Para facilitar el desenrollamiento del ADN de los linfocitos circulantes se mantuvieron los portaobjetos en tampón de electroforesis (Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM y NaOH 300 mM, pH  $\geq$  13). La

migración del ADN fragmentado se realizó sometiendo a los portaobjetos a una electroforesis durante 30 minutos a 25 V y 300 mA a 4°C. Finalmente, las muestras se neutralizaron con tampón Tris 400 mM (pH 7,5) y los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para el análisis de imagen de los cometas, los portaobjetos se hidrataron y se tiñeron con 10 µL de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los cometas se analizaron mediante una aplicación personalizada del programa de análisis de imágenes AnalySys®.

Los resultados de la cuantificación del ADN fragmentado se mostraron como la media ± SD.

### Histología

Durante la necropsia se extrajeron los siguientes órganos: bazo, riñón izquierdo, pulmones e hígado. Dichos órganos fueron pesados en una balanza de precisión (SCALTEC, SBA42). Se tomaron pequeñas porciones de cada órgano y se conservaron un mínimo de 7 días en formaldehído tamponado, al 10%. Posteriormente, las muestras se conservaron en etanol al 70% hasta el momento de englobarlas en moldes de parafina.

Antes de la confección de los bloques de parafinas, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación ascendente y posteriormente se les dio un baño en tolueno durante 40 minutos, para empezar con la inclusión en parafina (Paraplast HistoComp PF 55-58 °C).

Tras la inclusión en parafina, se confeccionaron los bloques de parafina. Se realizaron cortes de 5 µm con un micrótopo Leyca 2140, de cuchillas desechables, y se depositaron en agua desionizada con gelatina para ser capturados con portaobjetos.

La tinción se practicó en cubetas manuales mediante una modificación de la tinción clásica de Hematoxilina - Eosina con los siguientes pasos: Xileno (10 minutos) + Alcohol 96° (5 minutos) + Alcohol 70°-formol 10% (9:1) (10 minutos) + Agua destilada (5 minutos) + Hematoxilina (6 minutos) + Agua básica (pH:9)(10 minutos) + Eosina (5 minutos) + Alcohol absoluto (1 minuto) + Alcohol absoluto (5 minutos) + Alcohol absoluto (10 minutos) + Eucaliptol (10 minutos) (Comunicación personal de Miquel Borràs).

Tras la tinción se realizó el montaje con cubreobjetos y DPX, dejando secar durante 24 horas. Las preparaciones se observaron en un microscopio Nikon E400 con una cámara Leyca acoplada.

Se analizaron un mínimo de tres secciones de cada muestra. Las lesiones histológicas fueron cuantificadas según una escala convencional de 0 a 4, de acuerdo con su severidad y extensión (**Score**), siendo 0 las observaciones sin patología asociada, 1 con lesiones leves y observadas esporádicamente, 2: con alteraciones y relativa frecuencia, 3 con lesiones de observación y extensión moderada, 4: patologías ampliamente extendidas por el órgano.

Los resultados de las observaciones se tabularon por órganos y por patologías específicas de cada órgano. Multiplicando la severidad por el número de casos, se obtuvo un *índice* de la patología. Los resultados se expresaron como el promedio del índice de las patologías de cada órgano. La variable Media devuelve el promedio del índice de las patologías observadas por localidad.

### Estadística

La evaluación estadística se realizó usando el paquete estadístico SPSS Statistics versión 21 (IBM).

Las variables continuas se analizaron mediante la prueba de Levene, para comprobar la homocedasticidad de las varianzas. Posteriormente se aplicó el Modelo Lineal General, como estadísticos paramétricos, o el test de Kruskal-Wallis como estadístico no paramétrico.

Las diferencias entre grupos con varianzas homocedásticas se obtuvieron a partir del HSD del test de Tukey, mientras que si las varianzas no eran iguales se usó el estadístico de Games Howell. En el caso de las variables no paramétricas se usó el estadístico de la U- Mann Whitney.

## **5.3 Resultados**

### Dicromato potásico

#### Sistema experimental

Durante el estudio se registraron los pesos de los animales, así como durante la necropsia, se tomaron los pesos de los órganos relevantes (Tabla 5-7).

Los pesos de los individuos de la especie *Apodemus sylvaticus* recogidos en el ensayo mostraron que el peso corporal y el peso de los órganos fue superior en el grupo tratamiento respecto al grupo control. Por su parte, en el grupo de los ratones de laboratorio, al grupo experimental al que se le administró el tratamiento tenía significativamente un peso inicial mayor. El riñón también presentó más peso que el del grupo control.

Dada la experiencia del grupo de investigación, estas diferencias en los pesos iniciales no deberían ser, a priori, una variable relevante que desestimara los resultados posteriores, por lo que el ensayo siguió adelante.

Se han comparados las variables por cada sexo con el fin de ver su posible influencia. Los resultados muestran que las hembras del grupo tratamiento del ratón de laboratorio presentan pesos inferiores al de los machos.

Tabla 5-7.- Resumen de los pesos de los animales y de sus órganos incluidos en el estudio

Especie	Tratamiento	Sexo	N	Peso	±	SD	Bazo	±	SD	Hígado	±	SD	Riñón	±	SD
<i>A. sylvaticus</i>	Control	♂	6	20,19	±	3,81	0,02	±	0,01	0,82	±	0,10	0,10	±	0,01
		♀	6	24,34	±	4,22	0,03	±	0,00	0,73	±	0,17	0,09	±	0,02
		♂♀	12	22,27	±	4,40	0,02	±	0,01	0,77	±	0,14	0,10	±	0,01
	Tratamiento	♂	7	32,26	±	4,60	0,09	±	0,03	1,08	±	0,21	0,13	±	0,02
		♀	5	25,62	±	5,48	0,06	±	0,02	0,90	±	0,25	0,11	±	0,02
		♂♀	12	29,50	±	5,85	0,08	±	0,03	1,01	±	0,24	0,12	±	0,02
<i>M musculus</i>	Control	♂	6	22,39	±	5,86	0,11	±	0,01	2,12	±	0,36	0,28	±	0,02
		♀	6	22,68	±	4,46	0,11	±	0,00	2,04	±	0,12	0,29	±	0,01
		♂♀	12	22,53	±	4,97	0,11	±	0,01	2,08	±	0,26	0,28	±	0,02
	Tratamiento	♂	6	39,33	±	2,50	0,13	±	0,03	2,37	±	0,31	0,30	±	0,04
		♀	6	31,33	±	2,58	0,11	±	0,04	1,36	±	0,28	0,18	±	0,02
		♂♀	12	35,33	±	4,83	0,12	±	0,03	1,86	±	0,60	0,24	±	0,07

peso en g

#### Bioquímica Sérica

Los resultados de las determinaciones del perfil hepático y el perfil renal en el sérum de los ratones de campo mostraron que las diferencias entre tratamiento y control fueron del 10% para GPT, 59% para GOT, 1% para la Creatinina y un 5% para el nitrógeno ligado a urea.

Los resultados de las determinaciones del perfil hepático y el perfil renal en el sérum de los ratones de laboratorio estudiados mostraron que las diferencias entre tratamiento y control fueron del 7% para GPT, 10% para GOT, -8% para la Creatinina y un 16% para el nitrógeno ligado a urea.

La diferencia de respuesta entre ambas especies ante un tóxico hidrofílico como es el caso del dicromático potásico, muestra que *Apodemus sylvaticus* presenta una variación total del 68% respecto al perfil hepático versus un 17% de *Mus musculus domesticus*. Por lo que respecta al perfil renal, parece que el comportamiento de respuesta es similar entre especies, siendo un 6% para el ratón de campo y un 8% para el ratón de laboratorio.

Tras la exposición a dicromato potásico, *Apodemus sylvaticus* presenta una variación total del 88% respecto al perfil hepático versus un 17% de *Mus musculus domesticus*, mientras que, para el perfil renal, la respuesta es similar entre especies, siendo un 6% para el ratón de campo y un 8% para el ratón de laboratorio.

Estos resultados sugieren que el ratón de campo presenta una mayor respuesta hepática frente a la exposición a dicromato potásico.

Pese a que la estadística no reveló diferencias, se aprecia que hay un aumento de los valores obtenidos en el grupo tratamiento cuando son comparados con el grupo control. Por otro lado, también se observa un incremento de la desviación estándar, hecho que recuerda a la variabilidad intraespecífica cuando se expone a un tóxico a una concentración subletal.

En la Tabla 5-9 se muestra el resumen de las diferencias de los valores obtenidos en la determinación sérica entre el grupo tratamiento y el grupo control del estudio con exposición a dicromato potásico, expresado por cada especie estudiada

Si comparamos los resultados obtenido en el control y en el tratamiento de cada especie, las hembras de *Apodemus sylvaticus* parecen ser especialmente sensibles dado que el incremento de respuesta es mayor respecto a los machos. En el caso del ratón de laboratorio este incremento no es tan acusado, incluso en alguna determinación, es negativo, es decir, el valor del control es mayor que el del grupo tratado.

Tabla 5-8.- Resumen de los resultados obtenidos tras la determinación de la bioquímica sérica en el estudio con dicromato potásico

Especie	Tratamiento	Sexo	GPT	±	SD	GOT	±	SD	Cr	±	SD	BUN	±	SD
<i>A. sylvaticus</i>	Control	♂	51,00	±	15,47	91,50	±	52,11	1,00	±	0,23	16,17	±	3,43
		♀	61,83	±	17,36	63,83	±	35,45	1,03	±	0,24	16,33	±	3,27
		♂♀	56,42	±	16,66	77,67	±	44,88	1,02	±	0,22	16,25	±	3,19
	Tratamiento	♂	54,00	±	25,30	125,86	±	36,21	0,99	±	0,28	16,43	±	3,21
		♀	72,80	±	17,37	119,40	±	38,98	1,06	±	0,36	18,00	±	3,87
		♂♀	61,83	±	23,51	123,17	±	35,76	1,02	±	0,30	17,08	±	3,42
<i>M. musculus</i>	Control	♂	58,83	±	17,09	112,17	±	42,44	1,17	±	0,10	14,83	±	1,72
		♀	63,83	±	7,14	107,00	±	20,00	1,13	±	0,08	16,00	±	3,41
		♂♀	61,33	±	12,76	109,58	±	31,74	1,15	±	0,09	15,42	±	2,64
	Tratamiento	♂	55,17	±	22,36	126,00	±	68,72	1,08	±	0,26	16,50	±	2,07
		♀	76,50	±	24,16	114,17	±	63,27	1,03	±	0,08	19,33	±	4,27
		♂♀	65,83	±	24,83	120,08	±	63,28	1,06	±	0,18	17,92	±	3,53

GOT (UI/L), GPT (UI/L), Cr: Creatinina (mg/dL), BUN (mmol/l); \*  $p < 0,05$

#### Comet assay

En el estudio de genotoxicidad mediante el Comet assay, tanto *Apodemus sylvaticus*, como *Mus musculus domesticus* mostraron que el valor inicial del porcentaje de ADN en cola de los linfocitos circulantes partía de un nivel medio elevado, partiendo del mismo nivel tanto los animales control como los del grupo tratamiento (Tabla 5-10).

Tabla 5-9.- Resumen por especie de las diferencias de la determinación sérica entre el grupo tratamiento y el grupo control del estudio con exposición a dicromato potásico.

Especie	Sexo	GPT	GOT	Creatinina	BUN
<b>A. sylvaticus</b>	♂	6%	38%	-1%	2%
	♀	18%	87%	3%	10%
	♂♀	10%	59%	1%	5%
<b>M. musculus</b>	♂	-6%	12%	-7%	11%
	♀	20%	7%	-9%	21%
	♂♀	7%	10%	-8%	16%

El análisis de los resultados del Comet assay en linfocitos circulantes mostró que para la especie *Apodemus sylvaticus* hay un incremento basal del 15% del ADN fragmentado en cola desde el inicio del estudio hasta el día 28. Este resultado sale de comparar el % inicial dentro del grupo control. En el grupo tratado, el incremento desde el día 0 hasta el día 28 en el grupo control es del 27%, por lo que existe un incremento teórico del 12% adicional.

Tabla 5-10.- Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo del cometa en el estudio con dicromato potásico

Especie	Tratamiento	Sexo	DNA inicial	±	SD	DNA final	±	SD
<b>A. sylvaticus</b>	Control	♂	54,08	±	5,21	61,71	±	2,08
		♀	56,23	±	3,76	65,26	±	8,17
		♂♀	55,16	±	4,48	63,49	±	5,98
	Tratamiento	♂	54,49	±	9,05	73,45	±	4,04
		♀	54,53	±	4,53	63,64	±	8,54
		♂♀	54,51	±	7,22	69,36	±	7,81
<b>M. musculus</b>	Control	♂	54,32	±	16,15	69,93	±	5,34
		♀	63,47	±	2,23	70,98	±	4,93
		♂♀	58,89	±	11,99	70,46	±	4,93
	Tratamiento	♂	65,11	±	13,05	79,97	±	3,27
		♀	61,19	±	4,31	70,48	±	13,75
		♂♀	63,15	±	9,49	75,23	±	10,74

El análisis de los resultados del Comet assay en linfocitos circulantes mostró que para la especie *Mus musculus* también hay un incremento basal del 20% promedio en porcentaje de ADN en cola, desde el inicio del estudio, hasta el día 28. En el grupo tratado, el incremento desde el día 0 hasta el día 28 en el grupo control es del 19%, por lo que la respuesta de *Mus*

*musculus* a la exposición sistémica no presenta incremento relevante en el % de ADN en la cola.

En ambas especies se aprecia un incremento de los valores iniciales respecto a los valores finales. Sorprende el incremento sufrido por los animales del grupo control, tanto en ratón de campo como en ratón de laboratorio. En especial destaca la diferencia de los valores del porcentaje de ADN en cola al finalizar el experimento, en el grupo de los machos del ratón de campo ( $p < 0,05$ ). Estos valores sugieren que los machos de esta especie son más sensibles al dicromato potásico que las hembras. Sin embargo, esta diferencia significativa no se observa en los ratones de laboratorio.

### Histología

Los resultados de la evaluación histopatológica de bazo, riñón, pulmón e hígado de la especie *Apodemus sylvaticus* y *Mus musculus domesticus* se detalla en la Figura 5-1.

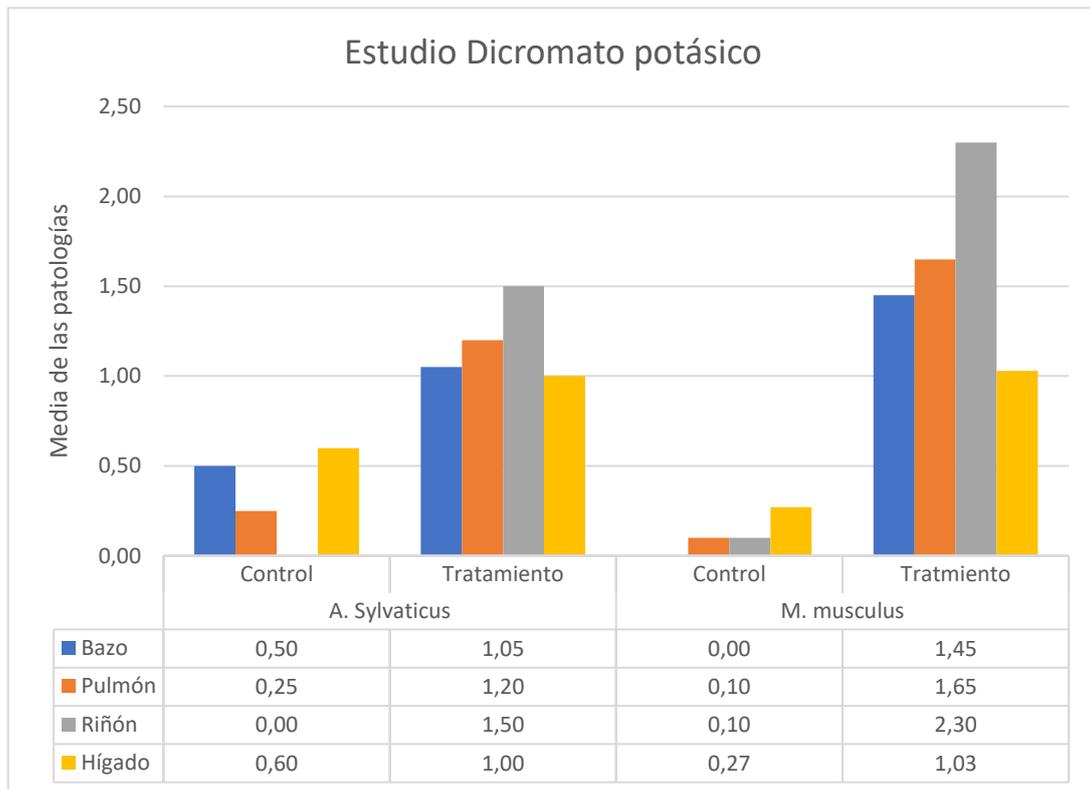


Figura 5-1.- Histograma de la media de las patologías observada en el estudio con dicromato potásico

El examen histológico del bazo mostró que ambas especies respondieron al tratamiento y que el efecto fueron moderados. La media de las patologías encontradas en los animales tratados fue similar en ambas especies, siendo superior la que presentó *Mus musculus domesticus*. Además, en el grupo tratamiento de *Apodemus sylvaticus*, las lesiones esplénicas incluyeron:

también una desorganización de la pulpa blanca en 6 animales tratados (versus ninguno de los controles).

La evaluación histológica del pulmón mostró que ambas especies respondieron al tratamiento y que el efecto fue moderado. La media de las patologías encontradas en los animales tratados fue similar en ambas especies, siendo ligeramente superior en *Mus musculus domesticus*. Sin embargo, entre los *Mus musculus* tratados, 4 de ellos mostraron hiperemia, 1 presentó hemorragia y 2 presentaron desorganización del epitelio bronquial, mientras que en los *Apodemus sylvaticus* tratados, 3 presentaron hiperemia alveolar y 1 presentó un adenoma (1 animal control presentó hemorragia extensa).

El examen histológico del riñón, mostró que el efecto provocado por el dicromato potásico en *Apodemus sylvaticus* fue moderado. La media del Score de las patologías encontradas en los animales tratados fue diferente en ambas especies, mientras que *Apodemus sylvaticus* presentó un valor de 1.5, en *Mus musculus domesticus* obtuvo un valor de 2.3. Cabe destacar que la necrosis tubular encontrada en el grupo tratamiento de *Mus musculus* se observó principalmente en los túbulos contorneales distales. Esta condición también se observó, con características similares, en alguno de los *Apodemus sylvaticus* tratados (pero no en los controles).

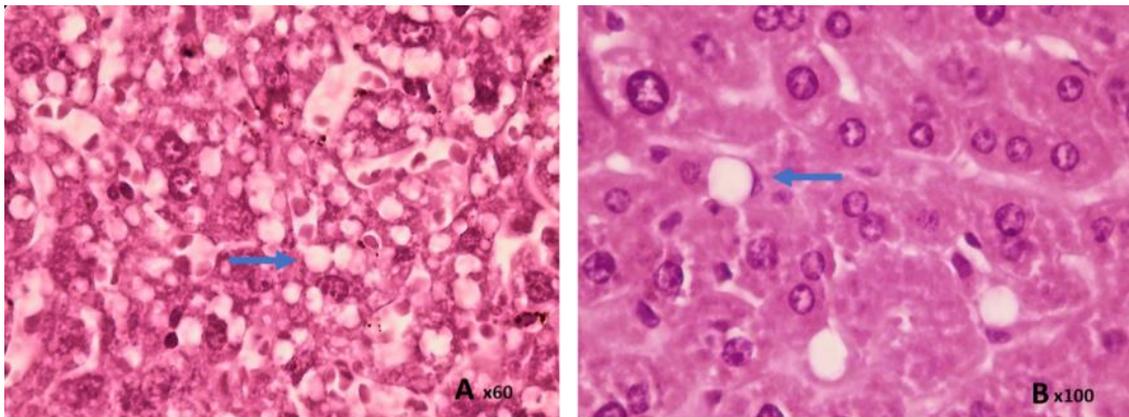


Figura 5-2.- Detalle de las patologías observadas en los animales tratados. A: Esteatosis microgutular en *Mus musculus domesticus*; B: Células de Ito en *Apodemus sylvaticus*.

La observación de las preparaciones de hígado mostró que ambas especies respondieron al tratamiento. La media de las patologías encontradas en los animales tratados fue similar en ambas especies. Relevante fue la gestión tisular del almacenamiento de grasa que se observó en los animales tratados de ambas especies (pero no en los controles), en los 4 *Mus musculus domesticus* afectados, este almacenamiento se dio en forma de esteatosis microgutular mientras que el almacenamiento a través de la proliferación de células Ito se dio en 6 de los *Apodemus sylvaticus* tratados.

## Tricloroetileno

### Sistema experimental

Durante el estudio en el que se administró a los animales un tóxico lipofílico se registraron los pesos de los animales, así como, en el momento de la necropsia se tomaron los pesos de los órganos relevantes (Tabla 5-11). Los pesos de los individuos de la especie *Apodemus sylvaticus* recogidos en el ensayo mostraron que el peso corporal y el peso de los órganos fue similar en el grupo tratamiento respecto al grupo control.

Tabla 5-11.- Resumen de los pesos de los animales y de sus órganos incluidos en el estudio con administración de tricloroetileno.

Especie	Tratamiento	Sexo	N	Peso	±	SD	Bazo	±	SD	Hígado	±	SD	Riñón	±	SD
<b><i>A. sylvaticus</i></b>	Control	♂	6	19,49	±	2,60	0,02	±	0,00	0,67	±	0,09	0,11	±	0,02
		♀	6	16,19	±	1,78	0,03	±	0,01	0,68	±	0,14	0,10	±	0,00
		♂♀	12	17,84	±	2,73	0,03	±	0,01	0,68	±	0,11	0,11	±	0,01
	Tratamiento	♂	6	15,72	±	2,60	0,03	±	0,00	0,57	±	0,09	0,09	±	0,02
		♀	6	17,42	±	2,42	0,02	±	0,01	0,62	±	0,08	0,27	±	0,28
		♂♀	12	16,57	±	2,55	0,02	±	0,01	0,59	±	0,09	0,18	±	0,21
<b><i>M musculus</i></b>	Control	♂	6	34,63	±	4,36	0,11	±	0,00	2,07	±	0,09	0,28	±	0,00
		♀	6	27,75	±	4,53	0,11	±	0,02	2,06	±	0,04	0,26	±	0,04
		♂♀	12	31,19	±	5,56	0,11	±	0,01	2,06	±	0,07	0,27	±	0,03
	Tratamiento	♂	6	26,00	±	4,10	0,10	±	0,01	1,48	±	0,08	0,19	±	0,00
		♀	6	25,00	±	1,90	0,11	±	0,03	1,42	±	0,21	0,19	±	0,02
		♂♀	12	25,50	±	3,09	0,11	±	0,02	1,45	±	0,16	0,19	±	0,01

### Bioquímica Sérica

Los resultados de las determinaciones del perfil hepático y el perfil renal en el sérum de los ratones de campo estudiados mostró que las diferencias entre tratamiento y control fueron del 29% para GPT, 48% para GOT, 8% para la Creatinina y un 1% para el nitrógeno ligado a urea (Tabla 5-12). Los resultados sugieren que hay un incremento medio apreciable en la determinación bioquímica entre los individuos del grupo tratamiento y los del grupo control.

Los resultados de las determinaciones del perfil hepático y el perfil renal mostró que las diferencias entre tratamiento y control fue nula para GPT, del 13% para GOT, del 9% para la Creatinina y de un -2% para el nitrógeno ligado a urea. Los resultados sugieren que no hay un patrón de incremento medio en la determinación bioquímica de los compuestos analizados.

Tras la exposición a tricloroetileno, *Apodemus sylvaticus* presenta una variación total del 78% respecto al perfil hepático inicial versus un 13% de *Mus musculus*, mientras que, para el perfil renal, parece que el comportamiento de respuesta es similar entre especies, siendo un 8% para el ratón de campo y un 7% para el ratón de laboratorio.

Estos resultados sugieren que el ratón de campo presenta una mayor respuesta frente a la exposición a tricloroetileno comparado con el ratón de laboratorio.

Tabla 5-12.- Resumen de los resultados obtenidos tras la determinación de la bioquímica sérica en el estudio con administración de tricloroetileno.

Especie	Tratamiento	Sexo	GPT	±	SD	GOT	±	SD	Cr	±	SD	BUN	±	SD
<i>A. sylvaticus</i>	Control	♂	54,50	±	26,31	89,17	±	31,32	1,12	±	0,10	16,00	±	3,10
		♀	61,83	±	12,81	112,00	±	34,94	1,00	±	0,23	15,00	±	0,89
		♂♀	58,17	±	20,10	100,58	±	33,81	1,06	±	0,18	15,50	±	2,24
	Tratamiento	♂	76,33	±	14,08	123,83	±	59,85	1,10	±	0,43	14,33	±	1,21
		♀	73,83	±	11,46	174,83	±	43,20	1,18	±	0,27	16,83	±	2,86
		♂♀	75,08	±	12,31	149,33	±	56,44	1,14	±	0,34	15,58	±	2,47
<i>M. musculus</i>	Control	♂	70,17	±	12,16	121,17	±	71,76	1,00	±	0,24	16,67	±	2,16
		♀	74,83	±	10,21	87,50	±	51,15	1,03	±	0,26	17,33	±	2,50
		♂♀	72,50	±	10,98	104,33	±	61,96	1,02	±	0,24	17,00	±	2,26
	Tratamiento	♂	75,67	±	26,89	163,67	±	43,94	1,13	±	0,37	17,67	±	4,50
		♀	69,33	±	9,16	72,83	±	30,28	1,08	±	0,26	15,50	±	3,73
		♂♀	72,50	±	19,44	118,25	±	59,54	1,11	±	0,30	16,58	±	4,10

Cr: Creatinina

Por lo que respecta a la variación de respuesta entre sexos, las hembras de *Apodemus sylvaticus* parecen ser especialmente sensibles en el metabolismo renal dado que el incremento de respuesta es mayor, si lo comparamos con los machos. En el caso del ratón de laboratorio son los machos los que presentan una especial sensibilidad frente a la exposición al tóxico.

En la Tabla 5-13 se muestra el resumen de las diferencias de los valores obtenidos en la determinación sérica entre el grupo tratamiento y el grupo control del estudio con exposición a dicromato potásico, expresado por cada especie estudiada

Tabla 5-13.- Resumen por especie de las diferencias de la determinación sérica entre el grupo tratamiento y el grupo control del estudio con exposición a dicromato potásico.

Especie	Sexo	GPT	GOT	Cr	BUN
<i>A. sylvaticus</i>	♂	40%	39%	-1%	-10%
	♀	19%	56%	18%	12%
	♂♀	29%	48%	8%	1%
<i>M. musculus</i>	♂	8%	35%	13%	6%
	♀	-7%	-17%	5%	-11%
	♂♀	0%	13%	9%	-2%

### Comet assay

En el estudio de genotoxicidad mediante el Comet assay, tanto *Apodemus sylvaticus*, como *Mus musculus domesticus* mostraron que el valor inicial de fragmentación del ADN en los linfocitos circulantes partía de un nivel medio elevado (Tabla 5-14).

Tabla 5-14.- Resumen de los resultados obtenidos en el ensayo del cometa en el estudio con administración de tricloroetileno.

Especie	Tratamiento	Sexo	DNA inicial	±	SD	DNA final	±	SD
<i>A. sylvaticus</i>	Control	♂	48,03	±	3,98	54,01	±	3,72
		♀	44,54	±	9,16	51,69	±	5,29
		♂♀	46,28	±	6,98	52,85	±	4,53
	Tratamiento	♂	45,94	±	7,25	60,99	±	13,26
		♀	41,70	±	7,30	61,12	±	16,44
		♂♀	43,82	±	7,28	61,06	±	14,24
<i>M. musculus</i>	Control	♂	30,34	±	3,00	35,86	±	5,82
		♀	32,90	±	3,41	36,25	±	6,08
		♂♀	31,62	±	3,34	36,05	±	5,68
	Tratamiento	♂	35,61	±	5,97	59,37	±	9,27
		♀	34,66	±	7,44	59,91	±	18,20
		♂♀	35,13	±	6,45	59,64	±	13,77

El análisis de los resultados del Comet assay mostró que para la especie *Apodemus sylvaticus* hay un incremento basal del 14% promedio en porcentaje de ADN en cola desde el inicio hasta el día 28. En el grupo tratado, el incremento desde el día 0 hasta el día 28 es del 39%, por lo que existe un incremento teórico del 25% adicional.

El análisis de los resultados del Comet assay mostró que para la especie *Mus musculus domesticus* hay un incremento basal del 14% en porcentaje de ADN en cola desde el inicio del estudio hasta el día 28. En el grupo tratado, el incremento desde el día 0 hasta el día 28 en el grupo control es del 70%, por lo que existe un incremento teórico del 56% adicional.

### Histología

Los resultados de la evaluación histopatológica de ambas especies de los órganos: bazo, riñón, pulmón e hígado se detallan en la Figura 5-3 :

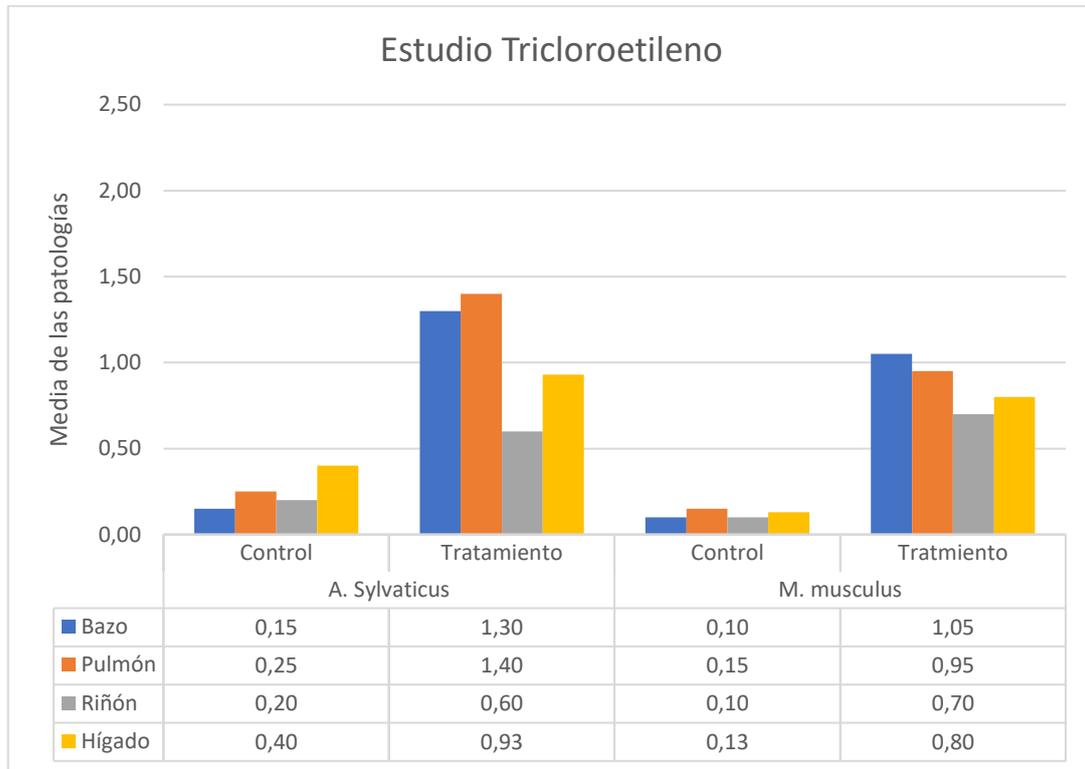


Figura 5-3.- Histograma de la media de las patologías observada en el estudio con tricloroetileno

El examen histológico del bazo mostró que ambas especies respondieron al tratamiento y que el efecto fue entre leve y moderado. La media de las patologías encontradas en los animales tratados fue similar en ambas especies, siendo ligeramente superior la que presentó *Apodemus sylvaticus* respecto a *Mus musculus domesticus*.

La valoración histológica del pulmón mostró que ambas especies respondieron al tratamiento y que el efecto fue entre leve y moderado. Destacaron las muestras observados con engrasamiento de los septos, así como la congestión pulmonar en los grupos tratados de ambas especies.

La observación histológica del riñón mostró que el efecto provocado por el tricloroetileno en ambas especies fue bajo, observándose un valor en la media de las nefropatologías muy leve, inferior al 1.

Las preparaciones de hígado mostraron que ambas especies respondieron al tratamiento. El valor medio de las patologías observadas no llegó al nivel de leve (1). Siendo las necrosis periportales, los depósitos de lipofuscina y la apoptosis las patologías observadas con más frecuencia entre los grupos tratados de ambas especies.

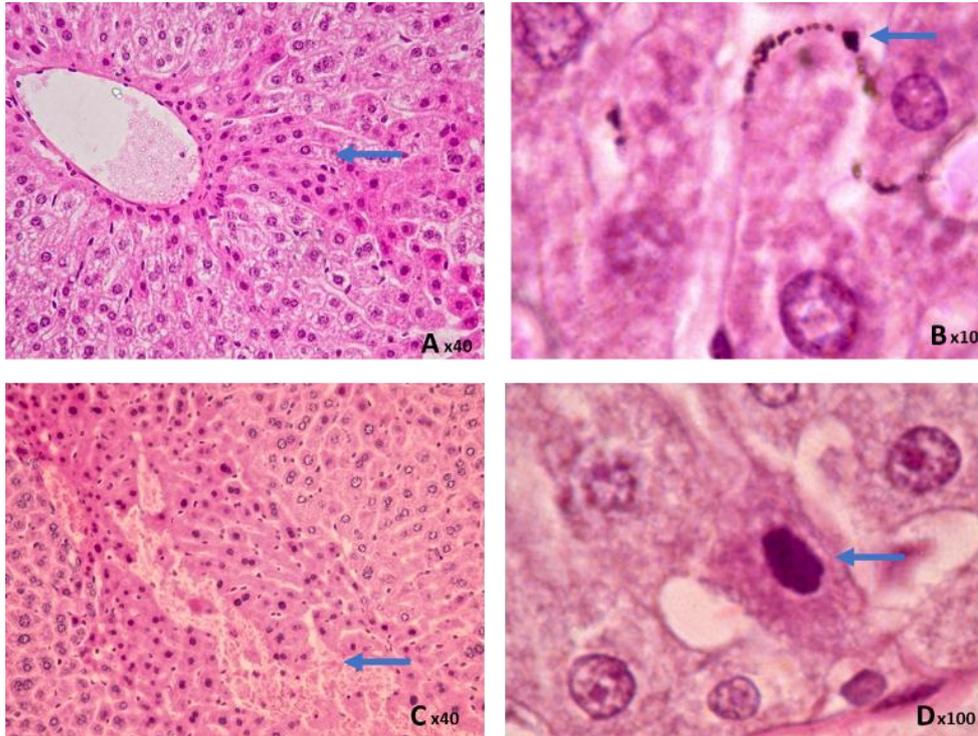


Figura 5-4.—Detalle de las patologías observadas en el hígado de los animales estudiados. A: Apoptosis en hepatocitos de *Apodemus sylvaticus*; B: Detalle de depósitos de Lipofuscina en células de Kuffer de *Apodemus sylvaticus*; C: Detalle de necrosis y regeneración en *Mus musculus domesticus*; D: Detalle de una célula apoptótica de *Mus musculus domesticus*

## 5.4 Discusión

La extrapolación interespecífica es uno de los aspectos más críticos de los estudios toxicológicos. Ya que, en términos generales, es necesario el uso de modelos, que implican frecuentemente, la utilización de modelos distintos de las especies diana, resulta crucial establecer hasta qué punto los efectos observados en la especie substituta son representativos de los que podemos esperar en la especie o especies que realmente nos incumben (Schmolke et al. 2010).

En el caso de la toxicología de fármacos o de los disruptores endocrinos, por ejemplo, es de gran importancia, poder determinar con qué grado de fiabilidad los resultados obtenidos en roedores pueden extrapolarse a los humanos (Habert et al. 2014).

De la misma manera, el uso de especies centinelas en la biomonitorización de los efectos de la contaminación sobre poblaciones naturales requiere extrapolar los resultados obtenidos en un modelo, idealmente lo más controlado posible, a la situación real y a distintas especies (Wainwright and Mulligan 2013).

En los estudios sobre la contaminación ambiental, nuestro grupo ha utilizado animales silvestres capturados *in situ* y también animales de laboratorio estabulados al aire libre en las localizaciones a estudiar (Borràs et al. 1998; Górriz-Férriz 1995).

Parecía, pues, un paso lógico estudiar también la respuesta de los animales silvestres estabulados en el laboratorio y comparar su respuesta con la de la especie más común en toxicología experimental, *Mus musculus domesticus*, con el fin de validar la extrapolación entre los distintos tipos de modelos empleados.

La diversidad en la respuesta a los tóxicos por parte de especies distintas, depende de las diferencias entre sus características toxicocinéticas, es decir, por un lado, de las capacidades de Absorción, Distribución y Excreción del tóxico en el organismo (que determinan sobre todo diferencias cuantitativas), y por otro, de su diferente Metabolización, que puede causar la presencia, la activación o la desactivación de determinados metabolitos tóxicos, dando lugar a diferencias cualitativas en la toxicidad. El estudio de estas características de respuesta frente a la exposición a sustancia se conoce como ADME (Hodgson 2001; Li 2001).

El metabolismo de tóxicos tiene lugar en diversos tejidos, pero de manera muy principal, especialmente en su primera fase, en el hígado, debiendo la molécula ser transportada hasta este órgano y ser capaz de penetrar hasta un ambiente tan lipofílico como es el ergastoplasma de los hepatocitos. Esta característica supone una diferencia en el tratamiento metabólico de los tóxicos en función de su polaridad o su lipofilidad.

Para que un tóxico sea excretado por la orina, es preciso que sea polar, es decir, soluble en medio acuoso. Los compuestos cuya naturaleza química les confiere una elevada polaridad son, en general, excretados en el riñón sin necesidad de sufrir ninguna modificación, de manera que solamente causarán efectos deletéreos si son tóxicos en su forma parental, y serán excretados en esta misma forma. Los tóxicos lipofílicos (no hidrosolubles), por el contrario, tendrán que sufrir antes de ser excretados una transformación metabólica con objeto de aumentar su solubilidad en medio acuoso.

Ya que buena parte de las diferencias entre especies, por lo que se refiere a la respuesta a tóxicos, dependen de sus diferentes dotaciones enzimáticas, es de esperar que las diferencias cualitativas se manifestarán principalmente en los tóxicos lipofílicos, mientras que la respuesta a tóxicos polares variará solamente de forma cuantitativa, dependiendo sobre todo de la absorción (Pelkonen et al. 1998).

El metabolismo de los tóxicos lipofílicos transcurre en dos fases:

1. una Fase I oxidativa, en la que los enzimas denominados p450, codificadas por los genes de la familia CYP, oxidan la molécula formando epóxidos; acopladas con éstos actúan unas epoxihidrolasas que rompen el enlace epóxido e introducen grupos hidroxilo, dando lugar a la formación de un diol.

2. y una Fase II conjugativa, en la que enzimas específicos, como las glutatióntransferasas, las metil-transferasas, acetato-transferasas y otras transferasas y conjugasas ligan grupos químicos apropiados, como el glutatión, en los grupos OH del diol

Este proceso metabólico tiene como objeto la inactivación de los tóxicos y su eliminación segura a través de la orina. Sin embargo, tales vías han evolucionado de forma más o menos específica en función de la exposición frecuente de la especie a determinados tóxicos concretos, inicialmente de origen natural; enfrentados a compuestos “nuevos”, de origen antropogénico, los enzimas proceden a metabolizarlos por analogía, dando lugar en algunos casos (por ejemplo, con los hidrocarburos aromáticos policíclicos, PAH) a la formación de diol-epóxidos, que son grupos funcionales extremadamente reactivos, capaces de producir efectos genotóxicos; con lo que un proceso que debería resultar destoxicante acaba, por el contrario, resulta activador, al producirse metabolitos tóxicos (Ding and Kaminsky 2003; Pelkonen et al. 2008).

Adicionalmente, es conocido que, variaciones individuales en la microbiota intestinal pueden marcar la respuesta tras la exposición a un xenobiótico. Por otra parte, se ha demostrado que el microbioma de los micromamíferos silvestres es susceptible de modificación dependiendo de la época del año, del tipo de hábitat, así como las fuentes nutricionales (Maurice et al. 2015; Viney 2019).

Partiendo de la base de que la flora intestinal juega un papel relevante y esencial en las primeras etapas de detoxificación, es razonable tener presente que la dotación microbiológica del intestino, de ambas especies de estudio, será distinta y por tanto que, a priori, los efectos observados pueden ser atribuidos a esta variabilidad.

En nuestro estudio hemos testado un tóxico de características fuertemente polares(dicromato potásico) y otro esencialmente lipofílico (el tricloroetileno), en dos especies animales muy próximas desde un punto de vista taxonómico, pero con una historia evolutiva diferente en los últimos milenios, ya que *Apodemus sylvaticus* se ha especializado en un modo de vida estrictamente silvestre, en zonas más o menos aisladas, mientras que *Mus musculus*, se adaptó desde tiempos antiguos, a vivir en ambientes fuertemente antropizados, y en estrecho contacto con las poblaciones humanas y sus diversos derelictos químicos.

El estudio de la bioquímica sérica revela algunas diferencias en la respuesta de ambas especies, tanto en el caso del tóxico polar como en el del lipofílico.

La administración de dicromato potásico produce en *Apodemus sylvaticus* un incremento discreto de los valores, tanto del perfil hepático como del perfil renal, siendo especialmente digno de mención el significativo aumento de los valores de GOT. En los ratones de laboratorio, sin embargo, solamente se ve alterado el perfil hepático, aunque en esta especie el incremento más importante corresponde a la GPT. Los valores de creatinina y BUN, en cambio, no indican afectación renal.

En el caso del tricloroetileno, únicamente aparece afectado significativamente el perfil hepático en *Apodemus sylvaticus*, mientras que los análisis no indican un efecto detectable del tóxico sobre los parámetros renales en esta especie, ni sobre el funcionalismo hepático ni renal en *Mus musculus domesticus*.

En cuanto a los resultados del ensayo del cometa, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, (probablemente debido a la SD y al número relativamente pequeño de animales analizados), las tendencias que señala el estudio pueden ser de algún interés. En primer lugar, ambos productos (genotóxicos conocidos) producen, como se esperaba, un aumento notable en el daño al ADN en ambas especies, lo que demuestra la utilidad del ensayo Comet en este escenario.

Más interesante aún, el tricloroetileno parece tener un efecto claramente más pronunciado en *Mus musculus domesticus* que en *Apodemus sylvaticus*, mientras que el efecto del cromo (podemos decir, una vez más, como se esperaba) es sensiblemente similar en ambas especies. Además, *A. sylvaticus* reacciona a ambas genotoxinas con aproximadamente el mismo nivel de daño en el ADN, mientras que *Mus* muestra valores más altos de % de ADN en la cola cuando se exponen a TCE. Los resultados sugieren que *Mus musculus domesticus* presenta una vía para la activación metabólica del tricloroetileno y que *Apodemus sylvaticus* no lo hace. Esta diferencia podría deberse al hecho de que *Mus musculus* ha sido una especie antropofílica durante siglos, mientras que *Apodemus sylvaticus* evita sistemáticamente la proximidad de las viviendas humanas. En ese sentido, *Mus musculus* ha sido mucho más desafiado por la presencia de sustancias de origen antropogénico, y este hecho pudo haber permitido el desarrollo evolutivo de los mecanismos de desintoxicación de moléculas con características estructurales que conducen a un tratamiento metabólico "equivocado" del tricloroetileno. Este mecanismo puede ser frecuentemente el origen de la activación metabólica de genotoxinas. Por tanto, en la perspectiva de nuestro estudio, una de las conclusiones más directamente relevante es que los resultados de genotoxicidad no pueden extrapolarse directamente de los ratones de laboratorio a los salvajes.

En lo que se refiere al estudio histológico, hemos de distinguir entre los resultados observados con cada uno de los dos tóxicos. Todo y que los compuestos polares no son propensos a mostrar grandes diferencias entre las especies, en el patrón de efectos toxicológicos producidos, nuestro estudio señala una respuesta diferencial en la incidencia y severidad de las lesiones histológicas, pero también, en ciertos casos, cualitativa, sugiriendo la implicación de diferentes mecanismos de acción.

Los efectos en el bazo, también son de divergentes, mientras que en *Mus musculus domesticus* sólo se han observado algunos casos de esplenomegalia, en *Apodemus sylvaticus* se observa una respuesta típica, incluyendo procesos como el de "Starry-Sky", una condición frecuentemente atribuida a la activación del eje pituitario-suprarrenal, y una distribución atípica de la pulpa blanca (posiblemente relacionada con la proliferación).

En el riñón, las patologías son similares, pero en menor grado en el ratón de campo. De manera inversa sucede en las patologías observadas en el pulmón, donde es *Mus musculus domesticus* quien presenta una menor severidad.

En el hígado, la acumulación de lipofuscina en las células de von Kupffer, en ambas especies, es un resultado esperable, dado el fuerte carácter oxidante del dicromato. Hay una clara inducción de inflamación y apoptosis en *Mus musculus*, que no está presente en *Apodemus sylvaticus*. Ambas especies muestran una tendencia definida al almacenamiento de grasa, pero a través de vías divergentes. Merece una mención especial la activación / proliferación de células de Ito en *Apodemus sylvaticus* (también conocidas como células estrelladas hepáticas) (Friedman 2008; Higashi, Friedman, and Hoshida 2017); este punto es relevante, ya que la esteatosis microgutular en los hepatocitos (caso de *Mus musculus domesticus*) es un fenómeno reversible tras suspender el tratamiento, y su pronóstico no reviste especial gravedad (Bujanda et al. 2010; Nguyen et al. 2008; Ress and Kaser 2016), mientras que la proliferación de células de Ito es frecuentemente precursora de degeneración cirrótica, que, a su vez, puede estar en el origen del desarrollo de hepatocarcinoma.

La composición o alteración de la flora intestinal está profundamente implicada en el desarrollo de patologías hepáticas. Esto es debido a que existe una conexión directa entre el hígado y el intestino, a través de la vena porta, por lo que la microbiota intestinal y los metabolitos fácilmente pueden influenciar la fisiología hepática (Hrncir et al. 2019). Los resultados observados sugieren que, tras la exposición a concentraciones subletales de tricloroetilenos, ambas especies acumulan grasa por diferentes vías y este hecho parece estar relacionado con la diferencia evidente entre la flora intestinal de cada una de ellas.

En el riñón y el pulmón, las patologías son similares, pero, globalmente, se presentan en menor grado en *Apodemus sylvaticus*.

Los efectos sobre el bazo también son divergentes; mientras que en *Mus musculus domesticus* solo se han observado unos pocos casos de esplenomegalia, el ratón de campo muestra una respuesta típica, que incluye "cielo estrellado", una condición frecuentemente atribuida a la activación del eje hipofisario-suprarrenal, y una distribución atípica de la pulpa blanca (posiblemente relacionada con la proliferación).

En el estudio con tricloroetileno la respuesta histopatológica es mucho más homogénea en las dos especies, al contrario de lo que hubiera podido esperarse *a priori*.

Las lesiones observadas en los órganos estudiados son similares en ambas, tanto cualitativamente (mismo tipo de respuesta) como en lo que se refiere a la severidad y extensión de las lesiones. El único elemento diferenciador que señalar sería la presencia de almacenamiento gutular hialino en el riñón de los *Mus musculus*, que, en general, aparece más afectado que en *Apodemus sylvaticus*, que sólo presenta nefritis intersticial, en grado leve.

## 5.5 Conclusiones

El presente estudio revela algunas diferencias destacables en la respuesta de dos especies taxonómicamente próximas, tanto frente a tóxicos polares como lipofílicos.

1. La respuesta enzimática detectada en los análisis de bioquímica sérica muestra una respuesta diferenciada, cualitativa y cuantitativamente, en lo que se refiere a la alteración del funcionalismo tanto hepático como renal.
2. El estudio de genotoxicidad mediante el Comet Assay demuestra una respuesta idéntica en ambas especies frente al tóxico polar (no sujeto a metabolismo hepático), mientras que en el caso del tóxico lipofílico el efecto genotóxico es muy superior en *Mus musculus domesticus* respecto a *Apodemus sylvaticus*. Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo de activación hepática del tricloroetileno en la especie más antropófila, mecanismo que estaría ausente en *Apodemus sylvaticus*.
3. Se observan ligeras diferencias en la respuesta histopatológica a los distintos tóxicos en las distintas especies, siendo especialmente destacable la especificidad en la forma de esteatosis producida por el dicromato potásico. Estos resultados indican una divergencia en los mecanismos de respuesta de ambas especies, no necesariamente dependientes del metabolismo hepático.
4. Se concluye que no es posible una extrapolación directa de los resultados toxicológicos entre dos especies, incluso taxonómicamente muy próximas, sino que se requiere una interpretación cuidadosa, que incluya la consideración de diversos factores.



## 6 DISCUSIÓN GENERAL

El análisis del riesgo es un proceso compuesto por tres etapas: la evaluación del riesgo, la gestión de riesgo y la comunicación del riesgo. La evaluación del riesgo es la etapa en la que los conocimientos científicos y la descripción cuantitativa cobran protagonismo. La gestión del riesgo es la etapa en que los objetivos sociales y los objetivos políticos se integran con el conocimiento científico, y en la que se deben tomar decisiones y elegir la mejor estrategia para minimizar los riesgos. Finalmente, la comunicación del riesgo es la etapa en la que se manifiesta la necesidad de transmitir y recibir la información de los diversos sectores del público, y por supuesto, de alcanzar a las partes afectadas. Esas etapas son interactivas e iterativas. La velocidad que marca la sociedad actual provoca que estas etapas se den, en muchas situaciones, simultáneamente.

La evaluación del riesgo se compone a su vez de cuatro etapas: la identificación del peligro, la caracterización del peligro, la determinación de la exposición y la caracterización del riesgo. La identificación del peligro es la etapa donde se identifican los agentes biológicos, los componentes químicos o físicos que son capaces de causar efectos adversos para salud, en este caso, de los ecosistemas. La caracterización del peligro es la etapa en la que se realiza una evaluación cuantitativa o cualitativa de la naturaleza de los efectos adversos asociados con el peligro potencial, es decir, se establecen los límites en los que el peligro tenga una probabilidad razonable de aparecer asumiendo la incertidumbre que ello puede conllevar. La determinación de la exposición es la etapa donde se determina, también de manera cuantitativa o cualitativa, la exposición del organismo estudiado a los peligros caracterizados anteriormente. Finalmente, la caracterización del riesgo es el proceso por el que se estima la probabilidad de que un peligro potencial y una exposición determinada, acabe produciendo un daño real.

Parece razonable pensar que la identificación y caracterización del peligro se deba realizar sobre los organismos que habitan el ecosistema. Sin embargo, razones obvias conducen a racionalizar los esfuerzos y abordar la información del peligro en base a unas pocos sistemas experimentales sobre los que podemos monitorizar las condiciones ambientales. Sin embargo, los gestores ambientales reconocen la necesidad de recibir información constante del ecosistema para evaluar la salud de éste.

Es en este punto donde los organismos que habitan el ecosistema pueden proporcionar información valiosa y en especial los organismos considerados centinelas que son aquellos que proporcionan señales precoces de la situación del entorno donde viven.

El objetivo principal del presente trabajo es caracterizar y estudiar al ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, para responder a la pregunta de si es un buen modelo de estudio por exposición a fuentes de contaminación ambiental crónicas, difusas y complejas mediante dos

abordajes, uno por evaluación del animal capturado in situ y otro mediante un modelo de estudio en mesocosmos.

La humanidad ha utilizado mamíferos y otros animales como señal de alarma frente a peligros potenciales. Durante décadas los mineros usaron canarios como centinelas de la concentración letal de gases a la que podían estar expuestos. Se han usado otros organismos como bacterias (Aubé et al. 2016), nematodos (Salamún, Hanzelov, and Miklisov 2018), insectos (Zarić et al. 2018), plantas (USGS 1992) o roedores (Sanchez-Chardi et al. 2009; da Silva Júnior, Eslava-Martins, A Muccillo-Baisch, et al. 2017; Tête et al. 2015). También se han usado centinelas acuáticos como cangrejos (Us Saher and Siddiqui 2019), bivalvos (Lise et al. 2018) peces (Salgado et al. 2019) o en ballenas (Sanpera et al. 1993). En concreto, *Apodemus sylvaticus*, ha sido caracterizado como bioindicador de contaminación ambiental compleja (de Lapuente et al. 2008; Sanchez-Chardi and Nadal 2007), sin embargo, es en el presente trabajo en el que se posiciona como un centinela.

Los resultados de los estudios presentados avalan la hipótesis de que *Apodemus sylvaticus* es un buen modelo de estudio para ser usado como centinela de contaminación por exposición crónica a fuentes de contaminaciones complejas. Los efectos en el ratón de campo han sido cuantificados y ha respondido a los diferentes orígenes de la contaminación, a las diferentes zonas de estudio y a la distancia al foco de emisión de dicha contaminación.

Los depósitos controlados son instalaciones destinadas a la eliminación de residuos que ya no pueden revalorizarse ni reutilizarse. En la época en la que se llevó a cabo el trabajo, seguramente, estos residuos generaron emisiones de gases y de lixiviados a los alrededores.

El índice de la condición corporal permite establecer la condición energética corporal y por lo tanto responder de manera eficaz ante situaciones de stress. Los resultados obtenidos mostraron que el acceso a alimento junto con una mejor gestión de los residuos en los depósitos controlados, mejora condición de los animales, como fue el caso del DC de Bellestar y el DC de Can Mata.

Los biomarcadores de efecto son las respuestas, en forma de biomolécula, lesión o de comportamiento, que puede provocar la exposición subletal a los xenobióticos. Tres depósitos controlados de residuos fueron caracterizados mediante la determinación de parámetros de bioquímica sérica, la caracterización del daño genotóxico por el ensayo de micronúcleos y el del comet assay, la medida del hematocrito y la cuantificación de los niveles de metales pesados y otros elementos, en tres órganos, como biomarcador de exposición. Los resultados obtenidos en la determinación de los parámetros de bioquímica sérica mostraron que el depósito controlado de Garraf presentó los valores del perfil hepático más elevado. Este valor está alineado con las lesiones hepáticas encontradas en la evaluación histológica. Los valores

elevados en el perfil renal parecen relacionados con las patologías en el riñón de los animales capturados en DC de Can Mata.

En los órganos de los animales capturados en la zona del DC de Bellestar se observó una mayor presencia de patologías esplénicas y renales. La presencia de apoptosis linfocitaria en el bazo se ha relacionado con elevados niveles de corticoides en sangre que frecuentemente viene asociado al estrés metabólico (Mancera et al. 2018; Morley and Levine 1982; Persson and Zakrisson 2015). Los animales del DC de Bellestar estaban significativamente más parasitados que el resto de las zonas de estudio. Esta parasitosis parece ser la explicación a la observación de un elevado número de megacariocitos que se suele relacionar con la hematopoyesis extramedular debido a pérdidas de sangre, asociada a parasitosis interna.

La zona control utilizada como referencia fue la sierra de Collserola. Ésta se sitúa entre la ciudad de Barcelona y su área metropolitana. Los animales capturados en Collserola presentaron una significativa incidencia de patologías pulmonares asociadas, seguramente, al transporte de partículas en suspensión procedentes del tráfico y del área fuertemente industrializada. Este hecho explicaría la elevada presencia de pneumoconiosis, acumulación de partículas en los macrófagos alveolares. Sin embargo, las patologías asociadas a contaminación edáfica no se observaron en una incidencia relevante.

El análisis de los niveles de metales pesados en los órganos de los animales capturados en el DC de Bellestar y en el DC de Can Mata fue comparado con el contenido de los animales de Collserola. En general, se encontró una mayor cantidad de elementos analizados en la zona de referencia, presumiblemente procedente del transporte de partículas en suspensión de las áreas adyacentes. Si comparamos las diferencias entre depósitos, los resultados mostraron unos valores significativamente elevados en el DC de Bellestar, concretamente en Molibdeno, Rubidio y Plomo. Sin embargo, destaca la mayor presencia de elementos constituyentes de pesticidas (Al, Fe, Zn) en la zona de Bellestar, hecho que explicaría las patologías encontradas en estos animales, bien por efecto directo o por el estrés que la exposición comporta (Andrade et al. 2018; Chi et al. 2016; Dell'Omo et al. 2003; Lukowicz et al. 2018). Adicionalmente, los valores de micronúcleos observados en los eritrocitos circulantes de los animales del DC de Bellestar y Garraf fueron significativamente superiores al del DC de Can Mata. Los tipos de residuos vertidos en cada zona son diferentes, sin embargo, ambos son susceptibles de causar clastogenicidad.

La valoración de los niveles de metales pesados requiere de una interpretación cuidadosa que pasa por conocer las composición y características geológicas de la zona, la movilización y biodisponibilidad de estos elementos, así como los componentes sinérgicos o antagonistas que ayudan a desvelar los escollos sobre su concentración interna y la adecuada interpretación de los efectos (van den Brink et al. 2010). Por otro lado, se ha de tener en

cuenta el número de muestras analizadas (González et al. 2006) o la flora intestinal (Viney 2019).

El estudio en el DC de Garraf sobre los efectos observados en *Apodemus sylvaticus* en función de la distancia a la fuente de emisión contaminante, mostró la relevancia de la distancia en relación con el biomarcador de estudio. Los animales capturados en la zona de influencia cercana a la balsa de lixiviados mostraron una leucocitosis marcada y una eosinopenia relevante. Los resultados sugieren que estos animales están sometidos a una carga de contaminación que se traduce en estrés fisiológico que provoca una inmunodepresión y por consiguiente una incidencia parasitaria mayor (Borràs and Nadal 2004; Feldman et al. 2000; Kahn 2005). Los animales capturados a 2 Km de la balsa de lixiviados fueron los que más patologías presentaron en el estudio histológico, en términos generales. Esta respuesta podría estar relacionada con las características geológicas del terreno y su composición, ya que podría hacer emerger contaminantes a distancias alejadas de la fuente de emisión (de Lapuente et al. 2014).

Uno de los resultados, más significativos, aunque parezca obvio, es que los resultados medios de los animales capturados en la zona control presentaron mucha menos afectación que los animales bajo la influencia del Depósito Controlado de Garraf. Por otro lado, los resultados muestran que los biomarcadores de efecto seleccionados muestran sensibilidades cuantificables distintas en función la distancia al foco de emisión.

También se abordó la problemática del vertido de lodos de depuradora en suelo agrícola como fuente de nutrientes usando a *Apodemus sylvaticus* como modelo centinela. Este tipo de vertido se ha señalado, también, como fuente de contaminación compleja por su contenido en compuesto xenobióticos y metales pesados. De manera adicional se ha de contemplar la aplicación de pesticidas en los campos de cultivos. El estudio consistió en caracterizar mediante biomarcadores de exposición, por cuantificación de metales pesados, y biomarcadores de exposición, por evaluación histológica, cuantificación de micronúcleos y enzimática en sangre, unos campos de cultivos donde se habían vertido lodos de depuradora previamente (Llots vells), donde se habían vertido ese periodo (Llots nous) y se comparó con un control de referencia de cultivo agrícola (Control Conreu) y un control negativo (Control Abrera).

Los resultados de la exposición a los elementos analizados mostró que la zona de Llots vells fue la que presentó un acúmulo mayor, aunque dado el número de individuos capturados en esa zona, los valores se deben evaluar con cierta precaución. El Zinc, es un metal pesado esencial cuya biodisponibilidad está asociada a las variaciones de pH del suelo (Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2001). El hecho de que las zonas donde se vertieron lodos presentaron unos niveles más elevados de Zn, tanto en hígado como en riñón, respecto a las dos zonas

controles, sugiere que el pH del suelo agrícola juega un papel determinante en la biodisponibilidad del elemento. Destaca, sin embargo, una concentración de cromo, nada despreciable, en los animales de la zona Llots nous. La presencia de este elemento estaría alineada con los resultados encontrados en el número de micronúcleos en eritrocitos circulantes de los animales capturados (Desmarías and Costa 2019). El estudio histológico mostró una incidencia mayor en las zonas sometidas al cultivo respecto a las que no. Las patologías esplénicas y hepáticas se mostraron con mayor frecuencia en la zona de Llots Nous, mientras que las patologías renales lo hicieron en las zonas cultivadas. Por el contrario, las lesiones pulmonares, básicamente por congestión de los septos alveolares, fueron las más recuentes en la zona Control Conreu. Los valores de creatinina relativamente mayores en la zona Control y los valores significativamente elevados de la transaminasa GPT en la zona de Llots vells sugieren la presencia de agentes estresantes que no fueron abordados en el estudio.

En conjunto, los resultados del estudio del vertido de lodos en campos agrícolas indican la problemática asociada, del uso de pesticidas, que provoca efectos sobre la salud de la fauna silvestre (Dell'Omo et al. 2003; Liu et al. 2013; Reif 2017). Sin embargo, los efectos parecen revertir tras un periodo de carencia en el uso de lodos y de productos agrotécnicos.

La extrapolación de los valores límites entre especies es uno de los puntos más delicados en las evaluaciones del riesgo ambiental. Los valores límites los suelen marcar los estudios con modelos experimentales conocidos y en condiciones controladas. Dadas las incertidumbres que existen al usar valores obtenidos de otras especies se suelen usar factores de seguridad adicionales en función del número y tipo de ensayos realizados y la duración de estos. No obstante, resulta necesario conocer si los valores límites establecidos son representativos en la especie diana (Borràs and Nadal 2004; Forbes et al. 2008; Schmolke et al. 2010). Para comprobar esta representatividad se testó un tóxico polar (dicromato potásico) y otro lipofílico (tricloroetileno) en *Apodemus sylvaticus* y *Mus musculus domesticus*, dos especies relativamente cercanas, en términos taxonómicos, pero con una historia evolutiva diferente.

Los resultados del estudio de bioquímica clínica revelaron que la administración de dicromato potásico produce en *Apodemus sylvaticus* un incremento discreto de los valores tanto del perfil hepático como del perfil renal, mientras que en los ratones de laboratorio únicamente se ve alterado el perfil hepático, aunque en esta especie el incremento más importante corresponde a la GPT. El resto de los valores estudiados (creatinina y BUN) no revelaron afectación renal relevante. Por lo que respecta al tratamiento con tricloroetileno, en *Apodemus sylvaticus* se ve afectado significativamente el perfil hepático, mientras apenas hay afectación en el perfil renal, mientras que en *Mus musculus domesticus* no hay afectación ni sobre la funcionalidad hepática ni sobre la renal.

Los estudios para detectar la genotoxicidad mostraron que ambos productos producen un aumento notable en el daño al ADN en ambas especies. Sin embargo, mientras los efectos del dicromato potásico han sido relativamente similares en ambas especies, los efectos del tricloroetileno parece tener mayor incidencia en *Mus musculus domesticus* que en *Apodemus sylvaticus*. Además, *Apodemus sylvaticus* presenta un daño en el ADN similar frente ambos genotóxicos, mientras que *Mus musculus domesticus* muestra valores más altos en el porcentaje de ADN en la cola cuando se exponen a tricloroetileno. Los resultados sugieren que *Mus musculus domesticus* presenta una vía para la activación metabólica del tricloroetileno que *Apodemus sylvaticus* no activa; esta diferencia podría ser debida a que *Mus musculus* ha sido una especie antropofílica, mientras que *Apodemus sylvaticus* ha ubicado su hábitat en zonas más alejadas a las poblaciones humanas. En ese sentido, *Mus musculus*, al estar más frecuentemente en contacto con xenobióticos de origen antropogénico ha podido desarrollar mecanismos de detoxificación de moléculas que conducen a un tratamiento metabólico "equivocado" del tricloroetileno. Este mecanismo puede ser frecuentemente el origen de la activación metabólica de genotoxinas (Reed, Arlt, and Phillips 2018).

Por lo que respecta al estudio histopatológico del tratamiento con dicromato potásico, los efectos en el bazo mostrados por *Mus musculus domesticus* fueron algunos casos de esplenomegalia, mientras que en *Apodemus sylvaticus* se observa una marcada apoptosis linfocitaria, posiblemente atribuible a la activación del eje pituitario-suprarrenal, y una distribución atípica de la pulpa blanca. En el riñón, las patologías son similares, pero en menor grado en el ratón de campo. De manera inversa sucede en las patologías observadas en el pulmón, donde es *Mus musculus domesticus* quien presenta una menor severidad. Por otro lado, dado el perfil oxidante del dicromato potásico, se observa en ambas especies una acumulación de lipofuscina en las células de von Kupffer del hígado. Hay una clara inducción de inflamación y apoptosis en *Mus musculus domesticus*, que no está presente en *Apodemus sylvaticus*. Por otro lado, ambas especies muestran una tendencia definida al almacenamiento de grasa, pero a través de vías divergentes. Merece una mención especial la proliferación observada de células de Ito en *Apodemus sylvaticus* frente a la esteatosis microgutular en los hepatocitos de *Mus musculus domesticus*. Mientras que la esteatosis es un fenómeno reversible y su pronóstico no reviste especial gravedad, la proliferación de células de Ito es frecuentemente precursora de degeneración cirrótica, que a su vez, puede ser el origen del desarrollo de hepatocarcinoma (Bujanda et al. 2010; Higashi et al. 2017). La composición o alteración de la flora intestinal, está profundamente implicada en el desarrollo de patologías hepáticas (Hrncir et al. 2019). Los resultados observados sugieren que ambas especies acumulan grasa por diferentes vías, y una posible explicación radicaría en la diferencia evidente entre la flora intestinal de cada una de las especies.

Es evidente que los resultados mostrados en todo el documento sugieren nuevos horizontes para abordar en el conocimiento de los centinelas de contaminación y en especial de *Apodemus sylvaticus*. La flora intestinal es el primer proceso de detoxificación o al menos por el que se reduce la exposición. Los parásitos, tanto internos como externos, influyen de manera negativa en el huésped y provocan estrés fisiológico. Sin embargo, reducen la exposición a los xenobióticos por parte del huésped, por lo que considerar al ratón de campo, como un ecosistema por sí mismo, debería proporcionar información valiosa. Por otro lado, la influencia del clima, la dinámica poblacional, la presión depredadora y la disponibilidad de alimento son factores que influyen en la respuesta del centinela estudiado ante la exposición a xenobióticos, por lo que considerar estudios en mesocosmos a escala de ecosistema aportaría una información integrada. Además, el uso de nuevas herramientas de diagnóstico rápido y de obtención de datos masivos, como serían las técnicas “ómicas”, proporcionarían gran cantidad de información adicional y relevante. Seguramente, en futuras investigaciones sobre el uso de *Apodemus sylvaticus* como centinela de contaminación, o en estudios con otros centinelas, estos tres enfoques deberían ser abordados de manera conjunta.

Resumiendo, el uso de centinelas de contaminación para la detección temprana de procesos de contaminación es necesario, incluso imprescindible. Para las latitudes mediterráneas se han propuestos otros pequeños micromamíferos para ser usados como centinelas de contaminación (Paukert 1986; Sanchez-Chardi et al. 2009; Sánchez-Chardi 2007; Sánchez-Chardi and López-Fuster 2009; da Silva Júnior, Eslava-Martins, A Muccillo-Baisch, et al. 2017). El uso de estos centinelas no es descartable y se ha de valorar su uso en función de la información que se quiera obtener, incluso valorar la posibilidad de escoger varios centinelas. Sin embargo, el ratón de campo por su ubicuidad, su alimentación omnívora, su prospección del terreno, su tolerancia a los tóxicos y a las capturas, y su relativa lejanía a las zonas humanizadas, puede integrar de manera cuantificable y diferencial la información que desprende el ecosistema donde habita, y por tanto proporcionar respuestas tempranas para la gestión.



## 7 CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos planteados al iniciar los estudios y en base a la discusión de los resultados obtenidos, las principales conclusiones de esta tesis doctoral son:

- 1- El modelo basado en el estudio de biomarcadores de exposición y efecto en ejemplares de ratón de campo, *Apodemus sylvaticus*, capturados *in situ*, ha resultado ser un buen método de estudio de contaminación ambiental, ya que la exposición crónica, difusa y compleja a xenobióticos de diversos orígenes, produjo una respuesta cuantificable y diferencial entre las zonas de estudio.
- 2- En efecto, la aplicación del modelo en depósitos controlados de residuos de distintas características permitió comprobar el efecto beneficioso de las medidas de seguridad, distinguir entre los efectos causados por vertidos de distintos orígenes y cuantificar la gradación de dichos efectos de acuerdo con la distancia al punto de vertido.
- 3- Igualmente, el modelo permitió diferenciar y cuantificar los efectos producidos por la aplicación de lodos de depuradora en campos de cultivo, según la existencia o no de un período de recuperación.
- 4- La extrapolación de los efectos toxicológicos observados de una especie a otras, incluso taxonómicamente próximas, no puede ser directa, sino que requiere una interpretación cuidadosa e integral, que incluya la consideración de diversos factores.
- 5- En el caso de *Apodemus sylvaticus* y *Mus musculus domesticus*, un tóxico polar, el dicromato potásico, produce un tipo de esteatosis hepática diferente, de pronóstico más grave en *Apodemus*. Esta diferencia, no atribuible a la variación en la dotación de los genes CYP, podría deberse a otros factores, como la diversidad interespecífica de la microbiota intestinal.
- 6- Un tóxico lipofílico (tricloroetileno) presenta un efecto genotóxico muy superior en *Mus musculus* que en *Apodemus sylvaticus*. Esta diferencia sugiere la existencia de algún mecanismo de activación metabólica del tóxico en *Mus musculus*, probablemente ligado al metabolismo detoxificador hepático de fase I.
- 7- Los estudios en mesocosmos pueden ser un complemento eficaz de los estudios de campo, siempre y cuando se tengan en cuenta las posibles dificultades de extrapolación en la interpretación de los biomarcadores, tanto por las diferencias entre especies como por las diferencias de exposición debidas a las condiciones del entorno, y la integración entre ambos enfoques puede mejorar significativamente la capacidad predictiva de los modelos.



## 8 Bibliografía

- Abrahamsson, K., A. Ekdahl, J. Collén, and M. Pedersén. 1995. "Marine Algae-a Source of Trichloroethylene and Perchloroethylene." *Limnology and Oceanography* 40(7):1321–26.
- Alba, D. M., S. Moyà-Solà, I. Casanovas-Vilar, J. Galindo, J. M. Robles, C. Rotgers, M. Furió, C. Angelone, M. Köhler, M. Garcés, L. Cabrera, S. Almécija, and P. Obradó. 2006. "Los Vertebrados Fósiles Del Abocador de Can Mata (Els Hostalets de Pierola, l'Anoia, Cataluña), Una Sucesión de Localidades Del Aragoniense Superior (MN6 y MN7+8) de La Cuenca Del Vallès-Penedès. Campañas 2002-2003, 2004 y 2005." *Estudios Geológicos* 62(1):295–312.
- Alonso, E., A. Alvarez, M. Callej O On Moch O On, J. C. Jim E Enez S A Anchez, and M. Ternero Rodr I Iquez. 2002. *Heavy Metal Extractable Forms in Sludge from Wastewater Treatment Plants*.
- Andrade, M., G. Escalona S, M. González, R. Reyna, J. Vargas, and J. Rendón. 2018. "Presence of Organochlorine Pesticides and Characterization of Biomarkers in Wild Mice Living in Crop Fields." *Therya* 9(3):209–18.
- Aubé, J., P. Senin, O. Pringault, P. Bonin, B. Deflandre, O. Bouchez, N. Bru, E. Birtxinaga-Etchart, C. Klopp, R. Guyoneaud, and M. Goñi-Urriza. 2016. "The Impact of Long-Term Hydrocarbon Exposure on the Structure, Activity, and Biogeochemical Functioning of Microbial Mats."
- Borràs, M., S. Llacuna, A. Górriz, and J. Nadal. 1998. "Hematological and Biochemical Parameters in Pollution-Exposed Mice." *Archives of Toxicology. Supplement. = Archiv Fur Toxikologie. Supplement* 20:189–95.
- Borràs, M. and J. Nadal. 2004. "Biomarkers of Genotoxicity and Other End-Points in an Integrated Approach to Environmental Risk Assessment." *Mutagenesis*.
- Bose, RN, S. Moghaddas, and D. Li. 2004. "Characterization of Long-Lived Chromium(IV) Intermediates in Glutathione Mediated Chromium(vi) Metabolites." *Mendeleev Communications* 1(3):108–10.
- van den Brink, N., D. Lammertsma, W. Dimmers, MC Boerwinkel, and A. van der Hout. 2010. "Effects of Soil Properties on Food Web Accumulation of Heavy Metals to the Wood Mouse (*Apodemus sylvaticus*)." *Environmental Pollution* 158(1):245–51.
- Brook, F. A. and J. R. Clarke. 2004. "Ovarian Interstitial Tissue of the Wood Mouse, *Apodemus sylvaticus*." *Reproduction*.
- Brotos, L., M. Magrans, L. Ferrús, and J. Nadal. 2011. "Direct and Indirect Effects of Pollution on the Foraging Behaviour of Forest Passerines during the Breeding Season." *Canadian Journal of Zoology*.
- Brzóska, M. M. and J. Moniuszko-Jakoniuk. 2001. "Interactions between Cadmium and Zinc in the Organism." *Food and Chemical Toxicology*.

- Bujanda, L., E. Hijona, L. Hijona, and JI Arenas. 2010. "Inflammatory Mediators of Hepatic Steatosis." *Mediators of Inflammation*.
- Bull, K. R., R. D. Roberts, M. J. Inskip, and G. T. Goodman. 1977. "Mercury Concentrations in Soil, Grass, Earthworms and Small Mammals near an Industrial Emission Source." *Environmental Pollution (1970)*.
- BUTLLETÍ OFICIAL DEL PARLAMENT DE CATALUNYA. 1999. *BUTLLETÍ OFICIAL DEL PARLAMENT DE CATALUNYA*.
- Chi, TE, G. Escalona, A. Vallarino, J. A. Vargas, GE Castillo, and J. Lara. 2016. "Organochlorine and Anticholinergic Pesticides in Wild Mice from Wetland Ecosystems of the Gulf of Mexico." *Therya* 7(3):465–82.
- Clarke, JR. 1985. "The Reproductive Biology of the Bank Vole (*Clethrionomys Glareolus*) and the Wood Mouse (*Apodemus sylvaticus*)." *Symposia of the Zoological Society of London*.
- Clément, B. and G. Merlin. 1995. "The Contribution of Ammonia and Alkalinity to Landfill Leachate Toxicity to Duckweed." *Science of the Total Environment* 170(1–2):71–79.
- Çolak, R., E. Çolak, and N. Yiğit. 2005. "Morphometric, Karyotypic and Electrophoretic Analysis of the Genus *Apodemus* Kaup, 1826 (Mammalia: Rodentia) in Thrace." *Turkish Journal of Zoology*.
- Çolak, R., E. Çolak, N. Yiğit, I. Kandemir, and M. Sözen. 2007. "Morphometric and Biochemical Variation and the Distribution of the Genus *Apodemus* (Mammalia: Rodentia) in Turkey." *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*.
- Cole, LJ, DI McCracken, GN Foster, and MN Aitken. 2001. "Using Collembola to Assess the Risks of Applying Metal-Rich Sewage Sludge to Agricultural Land in Western Scotland." *Agriculture, Ecosystems and Environment*.
- Collins, A. 2004. "The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations." *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*.
- Connett, P. H. and K. E. Wetterhahn. 1985. "*In vitro* Reaction of the Carcinogen Chromate with Cellular Thiols and Carboxylic Acids." *Journal of the American Chemical Society* 107(14):4282–88.
- Dahlin, Sigrun, Ernst Witter, Anna Mårtensson, Andrew Turner, and Erland Bååth. 1997. "Where's the Limit? Changes in the Microbiological Properties of Agricultural Soils at Low Levels of Metal Contamination." *Soil Biology and Biochemistry*.
- DECRET 353/1983. 1983. *DECRET 353/1983, de 15 de Juliol, de Declaració Del Parc Natural Del Cadí-Moixeró. - DOGC. Diari Oficial de La Generalitat de Catalunya - Legislació - VLEX 38349307*.
- Delgado-Sureda, E. 2002. "Avaluació de La Genotoxicitat En El Medi Terrestre : Utilització de l'electroforesi de Cèl·lules Individuals En Gels d'agarosa (Comet Test, o SCGE)." Universitat de Barcelona.
- Dell'Omo, G., M. G. Pleskacheva, D. P. Wolfer, H. P. Lipp, and R. F. Shore. 2003.

- “Comparative Effects of Exposure to an Organophosphate Pesticide on Locomotor Activity of Laboratory Mice and Five Species of Wild Rodents.” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70(1):138–45.
- Desmarias, TL and M. Costa. 2019. “Mechanisms of Chromium-Induced Toxicity.” *Current Opinion in Toxicology* 14:1–7.
- Díaz, M. and CL Alonso. 2003. “Wood Mouse *Apodemus sylvaticus* Winter Food Supply: Density, Condition, Breeding, and Parasites.” *Ecology*.
- Ding, X. and LS Kaminsky. 2003. “HUMAN EXTRALIVER CYTOCHROMES P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts.” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.
- Directiva 1999/31/CE. 1999. *Diario Oficial de Las Comunidades Europeas*.
- Directiva 2008/98/CE. 2008. *Diario Oficial de La Unión Europea*.
- Directiva 78/319/CEE. 1978. *Diario Oficial de Las Comunidades Europeas*.
- Directiva 86/278/CEE. 1986. *Diario Oficial de Las Comunidades Europeas*.
- Directiva 91/689/CEE. 1991. *Diario Oficial de La Unión Europea*.
- Directiva 97/62/CEE. 1997. *Diario Oficial de Las Comunidades Europeas*.
- Doherty, RE. 2000. “A History of the Production and Use of Carbon Tetrachloride, Tetrachloroethylene, Trichloroethylene and 1,1,1-Trichloroethane in the United States: Part 2--Trichloroethylene and 1,1,1-Trichloroethane.” *Environmental Forensics* 1(2):83–93.
- EC. 2003. “EC - La Comisión Emprende Acciones Judiciales Contra España Por Infringir El Derecho Medioambiental Comunitario.” 2003. Retrieved June 29, 2019 ([http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-05-417\\_es.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-417_es.htm)).
- ECHA. 2019a. “Potassium Dichromate.” Retrieved (<https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.029.005>).
- ECHA. 2019b. “Trichloroethylene.” Retrieved (<https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.001.062>).
- EFSA. 2009. “Risk Assessment for Birds and Mammals.” *EFSA Journal* 7(12):1438.
- EU RAR. 2005. *European Union Risk Assessment Report RISK ASSESSMENT*.
- EUROSTAT. 2019. “Estadísticas Sobre Residuos - Statistics Explained.” Retrieved June 29, 2019 ([https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Waste\\_statistics/es](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Waste_statistics/es)).
- Fairbairn, DW, PL Olive, and KL O'Neill. 1995. “The Comet Assay: A Comprehensive Review.” *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*.

- Feldman, BF, JG Zinkl, NC Jain, and OW Schalm. 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Forbes, V. E. and T. L. Forbes. 1994. *Ecotoxicology in Theory and Practice*.
- Forbes, Valery E., Peter Calow, and Richard M. Sibly. 2008. "THE EXTRAPOLATION PROBLEM AND HOW POPULATION MODELING CAN HELP." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(10):1987.
- Friedman, SL. 2008. "Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver." *Physiological Reviews*.
- García-Delgado, M., MS Rodríguez-Cruz, LF Lorenzo, M. Arienzo, and MJ Sánchez-Martín. 2007. "Seasonal and Time Variability of Heavy Metal Content and of Its Chemical Forms in Sewage Sludges from Different Wastewater Treatment Plants."
- González, X. I., J. R. Aboal, J. A. Fernández, and A. Carballeira. 2006. "Considerations on the Sample Size of Wood Mice Used to Biomonitor Metals."
- Górriz-Férriz, MA. 1995. "Efectes de La Contaminació Atmosfèrica a *Apodemus sylvaticus* i *Mus Musculus* / Director: J. Nadal Puigdefàbregas."
- Gorriz, A., S. Llacuna, M. Riera, and J. Nadal. 1996. "Effects of Air Pollution on Hematological and Plasma Parameters in *Apodemus sylvaticus* and *Mus Musculus*." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31(1):153–58.
- Gosàlbez, J. 1987. *Insectívors i Rosegadors de Catalunya*. edited by KETRES Editora S.A.
- Von Grote, J., C. Hurlimann, H. Hurlimann, M. Scheringer, K. Hungerbuhler, and H. Hungerbuhler. 2003. "Reduction of Occupational Exposure to Perchloroethylene and Trichloroethylene in Metal Degreasing over the Last 30 Years: Influences of Technology Innovation and Legislation." *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 13:325–40.
- Gupta, A. and P. Rajamani. 2015. "Toxicity Assessment of Municipal Solid Waste Landfill Leachate Collected In Different Seasons from Okhala Landfill Site of Delhi." *J. Biomedical Science and Engineering* 8:357–69.
- Habert, R., G. Livera, and V. Rouiller-Fabre. 2014. "Man Is Not a Big Rat: Concerns with Traditional Human Risk Assessment of Phthalates Based on Their Anti-Androgenic Effects Observed in the Rat Foetus." *Basic and Clinical Andrology* 24:14.
- Heddle, J. 1973. "A Rapid *in vivo* Test for Chromosomal Damage☆." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 18(2):187–90.
- Heuser, VD., J. da Silva, >h Moriske, JF Dias, ML Yoneama, and T. de Freitas. 2002. "Genotoxicity Biomonitoring in Regions Exposed to Vehicle Emissions Using the Comet Assay and the Micronucleus Test in Native Rodent *Ctenomys Minutus*." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 40(4):227–35.
- Higashi, T., SL Friedman, and Y. Hoshida. 2017. "Hepatic Stellate Cells as Key Target in Liver Fibrosis." *Advanced Drug Delivery Reviews*.

- Hodgson, J. 2001. "ADMET - Turning Chemicals into Drugs." *Nature Biotechnology*.
- Hrcir, T., L. Hrcirova, M. Kverka, and H. Tlaskalova-Hogenova. 2019. "The Role of Gut Microbiota in Intestinal and Liver Diseases." *Laboratory Animals* 53(3):271–80.
- IARC. 2012. *IARC MonoGRaphS-100C*.
- IARC. 2014. *TRICHLOROETHYLENE, TETRACHLOROETHYLENE, AND SOME OTHER CHLORINATED AGENTS VOLUME 106 IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS*.
- Jakob, EM, SD Marshall, and GW Uetz. 1996. "Estimating Fitness: A Comparison of Body Condition Indices." *Oikos* 77(1):61.
- Jha, AN. 2008. *Ecotoxicological Applications and Significance of the Comet Assay*. Vol. 23.
- Jonsson, P. and B. Silverin. 1997. "The Estrous Cycle in Female Wood Mice (*Apodemus sylvaticus*) and the Influence of Male." *Annales Zoologici Fennici*.
- Kahn, CM. 2005. *The Merck Veterinary Manual*. Merck & Co.
- Kennette, D., W. Hendershot, A. Tomlin, and S. Sauvé. 2002. "Uptake of Trace Metals by the Earthworm *Lumbricus Terrestris* L. in Urban Contaminated Soils." *Applied Soil Ecology*.
- Kreisinger, J., G. Bastien, HC Hauffe, J. Marchesi, and SE Perkins. 2015. "Interactions between Multiple Helminths and the Gut Microbiota in Wild Rodents." *Philosophical Transactions Royal Society B* 370(20140295).
- de Lapuente, J., M. Borràs, and J. Nadal. 2004. "Heavy Metals Accumulation on Wood Mouse (*Apodemus sylvaticus*) as a Marker for Edaphic and Atmospheric Pollution." *Toxicology Letters* 144(Supplement 1, 28):172.
- de Lapuente, J., J. González-Linares, E. Pique, and M. Borràs. 2014. "Ecotoxicological Impact of MSW Landfills: Assessment of Teratogenic Effects by Means of an Adapted FETAX Assay." *Ecotoxicology* 23(1):102–6.
- de Lapuente, J., J. González-Linares, J. Serret, X. Palaus, E. Teixidó, and M. Borràs. 2008. "Monitoring the Effects of a Complex Mixture of Pollutants next to the Lixivate Pool of a Mediterranean Landfill and along Its Draining Stream Using Wood Mouse Pathology and Arthropod Biodiversity." Pp. 1909–16 in *Fresenius Environmental Bulletin*. Vol. 17.
- de Lapuente, J., J. Lourenço, S. A. Mendo, M. Borràs, M. G. Martins, P. M. Costa, and M. Pacheco. 2015. "The Comet Assay and Its Applications in the Field of Ecotoxicology: A Mature Tool That Continues to Expand Its Perspectives." *Frontiers in Genetics* 6(JUN).
- Li, AP. 2001. "Screening for Human ADME/Tox Drug Properties in Drug Discovery." *Drug Discovery Today*.
- Lise, I., N. Bråte, R. Hurley, K. Iversen, J. Beyer, KV Thomas, CC Steindal, NW Green, M. Olsen, and A. Lusher. 2018. "Mytilus Spp. as Sentinels for Monitoring Microplastic Pollution in Norwegian Coastal Waters: A Qualitative and Quantitative Study \*."
- Liu, C., RM Sibly, V. Grimm, and P. Thorbek. 2013. "Linking Pesticide Exposure and Spatial

- Dynamics: An Individual-Based Model of Wood Mouse (*Apodemus sylvaticus*) Populations in Agricultural Landscapes.” *Ecological Modelling* 248:92–102.
- López-Mosquera, M. E., C. Moiró, and E. Carral. 2000. *Use of Dairy-Industry Sludge as Fertiliser for Grasslands in Northwest Spain: Heavy Metal Levels in the Soil and Plants*. Vol. 30.
- Lourenço, J., R. Pereira, F. Gonçalves, and S. Mendo. 2013. “Metal Bioaccumulation, Genotoxicity and Gene Expression in the European Wood Mouse (*Apodemus sylvaticus*) Inhabiting an Abandoned Uranium Mining Area.” 443:673–80.
- Lukowicz, C., S. Ellero-Simatos, M. Régnier, A. Polizzi, F. Lasserre, A. Montagner, Y. Lippi, EL Jamin, JF Martin, C. Naylies, C. Canlet, L. Debrauwer, J. Bertrand-Michel, T. Al Saati, V. Théodorou, N. Loiseau, L. Mselli-Lakhal, H. Guillou, and L. Gamet-Payraastre. 2018. “Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor.” *Environmental Health Perspectives* 126(6).
- Mancera, KF, M. Besson, A. Lisle, R. Allavena, and C. Phillips. 2018. “The Effects of Mining Machinery Noise of Different Amplitudes on the Behaviour, Faecal Corticosterone and Tissue Morphology of Wild Mice ( *Mus Musculus* ).” *Applied Animal Behaviour Science* 203:81–91.
- Margalef, R. 1998. *Ecología*. Omega.
- Maurice, C. F., S. Cl Knowles, J. Ladau, K. S. Pollard, A. Fenton, A. B. Pedersen, and P. J. Turnbaugh. 2015. “Marked Seasonal Variation in the Wild Mouse Gut Microbiota.” *The ISME Journal* 9:2423–34.
- Mendiola Goicoechea, MA. 2002. “Barreras Reproductoras Prezigóticas Entre *Apodemus sylvaticus* y *Apodemus Flavicollis* / María Aránzazu Mendiola Goicoechea ; Sota La Direcció de: Joaquim Gosálbez Noguera, Enriquer Castián Arriazu.”
- Mertens, J., S. Luysaert, S. Verbeeren, P. Vervaeke, and N. Lust. 2001. *Cd and Zn Concentrations in Small Mammals and Willow Leaves on Disposal Facilities for Dredged Material*.
- Milieu Ltd. WRc and RPA. 2008. *Environmental, Economic and Social Impacts of the Use of Sewage Sludge on Land Final Report Part I: Overview Report RPA*.
- Mishra, H., S. Karmakar, R. Kumar, and J. Singh. 2017. “A Framework for Assessing Uncertainty Associated with Human Health Risks from MSW Landfill Leachate Contamination.” *Risk Analysis* 37(7):1237–55.
- MMA. 2008. *Plan Nacional Integrado de Residuos, 2008-2015. Informe de Sostenibilidad Ambiental (ISA)*.
- Montgomery, S. S. J. and W. I. Montgomery. 1990. “Intrapopulation Variation in the Diet of the Wood Mouse *Apodemus sylvaticus*.” *Journal of Zoology*.
- Montgomery, W. I. 1980. “Population Structure and Dynamics of Sympatric *Apodemus* Species (Rodentia: Muridae).” *Journal of Zoology*.

- Moody, CM and TG Townsend. 2017. "A Comparison of Landfill Leachates Based on Waste Composition." *Waste Management* 63:267–74.
- Morley, J. E. and S. .. Levine. 1982. "Corticotrophin Releasing Factor, Grooming and Ingestive Behavior." *Life Sciences* 31(14):1459–64.
- Munn, K. J., J. Evans, and P. M. Chalk. 2000. "Mineralization of Soil and Legume Nitrogen in Soils Treated with Metal-Contaminated Sewage Sludge." *Soil Biology and Biochemistry*.
- Natarajan, AT. 2002. "Chromosome Aberrations: Past, Present and Future." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 504(1–2):3–16.
- Nguyen, P., V. Leray, M. Diez, S. Serisier, J. Le Bloc'H, B. Siliart, and H. Dumon. 2008. "Liver Lipid Metabolism." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.
- Norseth, T. 1981. "The Carcinogenicity of Chromium." *Environmental Health Perspectives* 40:121–30.
- Nunes, A. C., M. Da Luz Mathias, and A. M. Crespo. 2001. "Morphological and Haematological Parameters in the Algerian Mouse (*Mus Spretus*) Inhabiting an Area Contaminated with Heavy Metals." *Environmental Pollution*.
- Nyamangara, J. and J. Mzezewa. 1999. *The Effect of Long-Term Sewage Sludge Application on Zn, Cu, Ni and Pb Levels in a Clay Loam Soil under Pasture Grass in Zimbabwe*. Vol. 73.
- O'Brien, DJ, J. B. Kaneene, and R. H. Poppenga. 1993. "The Use of Mammals as Sentinels for Human Exposure to Toxic Contaminants in the Environment." *Environmental Health Perspectives* 99:351–68.
- O'Brien, P. and Z. Ozolins. 1989. "Mechanisms in the Reduction of Chromium(VI) with Glutathione." *Inorganica Chimica Acta* 161(2):261–66.
- OECD TG 471. 1997. *OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test*.
- OECD TG 473. 2016. *OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS Test No. 473: In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test*.
- OECD TG 474. 2014. *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. OECD.
- OECD TG 476. 1997. *Test No. 476: In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test*. OECD Publishing.
- Palomo, L. J. J. and J. Gisbert. 2002. *Atlas de Los Mamíferos Terrestres de España*. edited by L. J. Palomo and J. Gisbert. Madrid: Dirección General de Conservación de la Naturaleza - SECEM – SECEMU.
- Paukert, J. 1986. "The Hair of the Common Hare (*Lepus Europaeus* Pall.) and of the Common Vole (*Microtus Arvalis* Pall.) as Indicator of the Environmental Pollution." *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology* 30(1).
- Peig, J. and AJ Green. 2009. "New Perspectives for Estimating Body Condition from

- Mass/Length Data: The Scaled Mass Index as an Alternative Method." *Oikos* 118(12):1883–91.
- Peig, J. and AJ Green. 2010. "The Paradigm of Body Condition: A Critical Reappraisal of Current Methods Based on Mass and Length."
- Pelkonen, O., J. Mäenpää, P. Taavitsainen, A. Rautio, and H. Raunio. 1998. "Inhibition and Induction of Human Cytochrome P450 (CYP) Enzymes." *Xenobiotica*.
- Pelkonen, O., M. Turpeinen, J. Hakkola, P. Honkakoski, J. Hukkanen, and H. Raunio. 2008. "Inhibition and Induction of Human Cytochrome P450 Enzymes: Current Status." *Archives of Toxicology*.
- Persson, P. B. and A. Zakrisson. 2015. "Stress." *Acta Physio* 216:149–52.
- Polechová, J. and P. Stopka. 2010. "Geometry of Social Relationships in the Old World Wood Mouse, *Apodemus sylvaticus*." *Canadian Journal of Zoology*.
- Prout, M. S., W. M. Provan, and T. Green. 1985. "Species Differences in Response to Trichloroethylene. I. Pharmacokinetics in Rats and Mice." *Toxicology and Applied Pharmacology* 79(3):389–400.
- Reed, L., VM Arlt, and DH Phillips. 2018. "The Role of Cytochrome P450 Enzymes in Carcinogen Activation and Detoxication: An *in vivo-in vitro* Paradox." *Carcinogenesis* 39(7):851–59.
- Reglamento (CE) No 1272/2008. 2008. *EU-COM*.
- Reglamento (CE) No 1907/2006. 2006. *EU-COM*.
- Reif, JS. 2017. "Animal Sentinels for Environmental and Public Health." *Public Health Reports* 126(1\_suppl):50–57.
- Ress, C. and S. Kaser. 2016. "Mechanisms of Intrahepatic Triglyceride Accumulation." *World Journal of Gastroenterology*.
- Rocha, C., P. Cardoso, L. Cunha, C. Gomes, RR Júnior, RH Pinheiro, MH Costa, and R. Burbano. 2015. "Mutagenic Effects of Potassium Dichromate as Evaluated by Means of Animal and Plant Bioindicators." *In vivo (Athens, Greece)* 29(6):729–35.
- Rodríguez-Estival, J. and J. Smits. 2016. "Small Mammals as Sentinels of Oil Sands Related Contaminants and Health Effects in Northeastern Alberta, Canada." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124:285–95.
- Rogival, D., J. Scheirs, and R. Blust. 2007. "Transfer and Accumulation of Metals in a Soil-Diet-Wood Mouse Food Chain along a Metal Pollution Gradient." *Environmental Pollution* 145(2):516–28.
- Rogival, D., J. Scheirs, W. De Coen, R. Verhagen, and R. Blust. 2006. "Metal Blood Levels and Hematological Characteristics in Wood Mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a Metal Pollution Gradient." *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Roig, N., J. Sierra, E. Martí, M. Nadal, M. Schuhmacher, and JL Domingo. 2012. "Long-Term

- Amendment of Spanish Soils with Sewage Sludge: Effects on Soil Functioning.” *“Agriculture, Ecosystems and Environment”* 158:41–48.
- Sadovnikova, L., E. Otabbong, O. Iakimenko, I. Nilsson, J. Persson, and D. Orlov. 1996. *Dynamic Transformation of Sewage Sludge and Farmyard Manure Components. 2. Copper, Lead and Cadmium Forms in Incubated Soils.* Vol. 58.
- Salamún, P., V. Hanzelov, and D. Miklisov. 2018. “Variability in Responses of Soil Nematodes to Trace Element Contamination.”
- Salgado, Lilian Dalago, Antonio Ernesto Meister Luz Marques, Rafael Duarte Kramer, Fernando Garrido de Oliveira, Sarah Lott Moretto, Barbara Alves de Lima, Maritana Mela Prodocimo, Marta Margarete Cestari, Júlio Cesar Rodrigues de Azevedo, and Helena Cristina Silva de Assis. 2019. “Integrated Assessment of Sediment Contaminant Levels and Biological Responses in Sentinel Fish Species *Atherinella Brasiliensis* from a Sub-Tropical Estuary in South Atlantic.” *Chemosphere* 219:15–27.
- Sánchez-Chardi, A. 2007. “Tissue, Age, and Sex Distribution of Thallium in Shrews from Doñana, a Protected Area in SW Spain.” *Science of the Total Environment.*
- Sánchez-Chardi, A. and M. J. López-Fuster. 2009. “Metal and Metalloid Accumulation in Shrews (Soricomorpha, Mammalia) from Two Protected Mediterranean Coastal Sites.” *Environmental Pollution.*
- Sánchez-Chardi, A., C. C. Marques, S. I. Gabriel, F. Capela-Silva, A. S. Cabrita, M. J. López-Fuster, J. Nadal, and M. L. Mathias. 2008. “Haematology, Genotoxicity, Enzymatic Activity and Histopathology as Biomarkers of Metal Pollution in the Shrew *Crocicuda Russula*.” *Environmental Pollution* 156:1332–39.
- Sanchez-Chardi, A. and J. Nadal. 2007. “Bioaccumulation of Metals and Effects of Landfill Pollution in Small Mammals. Part I. The Greater White-Toothed Shrew, *Crocicuda Russula*.” *Chemosphere* 68(4):703–11.
- Sanchez-Chardi, A., C. Penarroja-Matutano, M. Borrás, and J. Nadal. 2009. “Bioaccumulation of Metals and Effects of a Landfill in Small Mammals Part III: Structural Alterations.” *Environmental Research.*
- Sánchez-Chardi, A., C. Peñarroja-Matutano, C. A. O. Ribeiro, and J. Nadal. 2007. “Bioaccumulation of Metals and Effects of a Landfill in Small Mammals. Part II. The Wood Mouse, *Apodemus sylvaticus*.” *Chemosphere* 70(1):101–9.
- Sanpera, C., R. Capell, V. Mingant, and L. Jover. 1993. *Total and Organic Mercury in North Atlantic Fin Whales Distribution Pattern and Biological Related Changes.* Vol. 26.
- Schmid, W. 1973. “Chemical Mutagen Testing on *in vivo* Somatic Mammalian Cells.” *Agents and Actions.*
- Schmolke, A., P. Thorbek, DL Deangelis, and V. Grimm. 2010. “Ecological Models Supporting Environmental Decision Making: A Strategy for the Future.” *Trends in Ecology and Evolution* 25:479–86.
- Sheffield, S. R., K. Sawicka-Kapusta, J. B. Cohen, and B. A. Rattner. 2001. “Rodentia and Lagomorpha.” 215–314.

- da Silva Júnior, F., S. Eslava-Martins, A Muccillo-Baisch, ML Mathias, F. Manoel, R. Da, S. Júnior, S. Eslava-Martins, A. Luíza Muccillo-Baisch, M. Da, and Mathias. 2017. "Mus Spretus as an Environmental Sentinel: A Review of 17 Years (1998–2015) of Research in Mediterranean Europe." *Ecological Indicators* 73:61–67.
- da Silva Júnior, F., S. Eslava-Martins, AL Muccillo-Baisch, and ML Mathias. 2017. "Mus Spretus as an Environmental Sentinel: A Review of 17 Years (1998–2015) of Research in Mediterranean Europe." *Ecological Indicators* 73:61–67.
- Smith, SR. 2008. "A Critical Review of the Bioavailability and Impacts of Heavy Metals in Municipal Solid Waste Composts Compared to Sewage Sludge." *Environment International* 35:142–56.
- Soucek, P. 2011. "Xenobiotics." Pp. 3964–67 in *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Stopka, P. and D. W. Macdonald. 1998. "Signal Interchange During Mating in the Wood Mouse (*Apodemus sylvaticus*): The Concept of Active and Passive Signalling." *Behaviour*.
- Stopka, Pavel and David W. Macdonald. 1999. "The Market Effect in the Wood Mouse, *Apodemus sylvaticus*: Selling Information on Reproductive Status." *Ethology*.
- Talmage, S. S. and B. T. Walton. 1991. "Small Mammals as Monitors of Environmental Contaminants." *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 119:47–145.
- Tête, N., E. Afonso, G. Bouguerra, and R. Scheifler. 2015. "Blood Parameters as Biomarkers of Cadmium and Lead Exposure and Effects in Wild Wood Mice (*Apodemus sylvaticus*) Living along a Pollution Gradient." *Chemosphere* 138:940–46.
- Tête, N., E. Afonso, N. Crini, S. Drouhot, AS Prudent, and R. Scheifler. 2014. "Hair as a Noninvasive Tool for Risk Assessment: Do the Concentrations of Cadmium and Lead in the Hair of Wood Mice (*Apodemus sylvaticus*) Reflect Internal Concentrations?" *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108:233–41.
- Tête, N., M. Durfort, D. Rieffel, R. Scheifler, and A. Sánchez-Chardi. 2014. "Histopathology Related to Cadmium and Lead Bioaccumulation in Chronically Exposed Wood Mice, *Apodemus sylvaticus*, around a Former Smelter." *Science of the Total Environment* 481(1):167–77.
- Tometsko, A., D. Torous, and S. Dertinger. 1993. "Analysis of Micronucleated Cells by Flow Cytometry. 3. Advanced Technology for Detecting Clastogenic Activity." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*.
- Torre, I., A. Arrizabalaga, and M. Díaz. 2002. "Ratón de Campo (*Apodemus sylvaticus*. Linnaeus, 1758)." *Geobios* 14(2).
- Torre, I., A. Ribas, C. Flaquer, and A. Arrizabalaga. 2009. "NUEVOS DATOS SOBRE LA DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA DEL RATÓN LEONADO *Apodemus Flavicolis* (MELCHIOR, 1834) EN CATALUNYA." *Galemys* 21:3–11.
- Torres, J., J. de Lapuente, C. Eira, and J. Nadal. 2004. "Cadmium and Lead Concentrations in Gallegoide Sarfaai (Cestoda: Anoplocephalidae) and *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) from Spain." *Parasitology Research* 94(6):468–70.

- Truhaut, R. 1977. "Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1(2):151–73.
- Ullrich, S. M., M. H. Ramsey, and E. Helios-Rybicka. 1999. "Total and Exchangeable Concentrations of Heavy Metals in Soils near Bytom, an Area of Pb/Zn Mining and Smelting in Upper Silesia, Poland." *Applied Geochemistry*.
- Us Saher, N. and S. Siddiqui. 2019. "Occurrence of Heavy Metals in Sediment and Their Bioaccumulation in Sentinel Crab (*Macrophthalmus Depressus*) from Highly Impacted Coastal Zone."
- USGS. 1992. "Use of Plants for the Assessment of Environmental Contaminants." *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Viney, M. 2019. "The Gut Microbiota of Wild Rodents: Challenges and Opportunities." *Laboratory Animals* 53(3):252–58.
- Wainwright, J. and M. Mulligan. 2013. *Environmental Modelling: Finding Simplicity in Complexity*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Zarić, N., I. Deljanin, K. Ilijević, L. Stanisavljević, M. Ristić, and I. Gržetić. 2018. "Honeybees as Sentinels of Lead Pollution: Spatio-Temporal Variations and Source Appointment Using Stable Isotopes and Kohonen Self-Organizing Maps."

