











Biomarcadores de estrés oxidativo en jabalí (*Sus scrofa*) del Noroeste de la Península Ibérica

Javier García-Muñoz^{1,*}, Ángel Portillo-Moreno¹, Juan Carlos Solomando González¹, David Fernández Casado¹,
Salomé Martínez-Morcillo¹, María Prado Míguez-Santián¹, Francisco Soler-Rodríguez¹, Ana López-Beceiro²,
Luis Eusebio Fidalgo-Álvarez², Marcos Pérez-López¹

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

(2) Dpto de Ciencias Clínicas Veterinarias. Facultad de Veterinaria (USC). Avda Carballo Calero s/n. 27002 Lugo.

*Autor de correspondencia: Javier García Muñoz [jgarciamz@unex.es]

> Recibido el 21 de julio de 2023 - Aceptado el 16 de octubre de 2023

Como citar: García-Muñoz, J., Portillo Moreno, Á., Solomando González, J.C., Fernández Casado, D., Martínez Morcillo, S., Míguez Santián, M.P., Soler Rodríguez, F., López Beceiro, A., Fidalgo Álvarez, L.E., Pérez-López, M. 2023. Biomarcadores de estrés oxidativo en jabalí (*Sus scrofa*) del Noroeste de la Península Ibérica *Ecosistemas* 32(3):2610. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2610>

Biomarcadores de estrés oxidativo en jabalí (*Sus scrofa*) del Noroeste de la Península Ibérica

Resumen: La existencia en el medio ambiente de compuestos químicos contaminantes constituye una amenaza tanto para los seres vivos como para el conjunto del ecosistema. Por ello, la Ecotoxicología está desarrollando nuevas herramientas, como el empleo de biomarcadores, con el objetivo de evaluar el efecto de estos agentes contaminantes. Muchos estudios hablan sobre el papel de los indicadores de estrés oxidativo como posibles parámetros de gran utilidad en el ámbito de la contaminación ambiental. Sin embargo, los estudios centrados en fauna salvaje, y más concretamente en el jabalí (*Sus scrofa*), son escasos, a pesar de la amplia distribución geográfica de este ungulado, lo cual permitiría su empleo como bioindicador en programas de biomonitorización ambiental. En el presente trabajo se determinaron los niveles de dos biomarcadores de estrés oxidativo, malondialdehído (MDA) y glutatión reductasa (GR), en el tejido renal de jabalíes procedentes del noroeste de España. Además, se evaluó la influencia del sexo en los valores obtenidos. Los valores medios globales fueron de 1.811 ± 0.426 nmoles/mg de proteína para el MDA, y 0.079 ± 0.019 picomol/min/mg de proteína para la actividad GR. Con respecto a la influencia del factor sexo, en los niveles de MDA se encontraron diferencias estadísticamente significativas, presentando unos niveles de estrés oxidativo superiores los machos con respecto a las hembras. Estos resultados constituyen una línea base de los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo en especies de caza mayor, con la finalidad de que sean empleados en futuros estudios de biomonitorización.

Palabras clave: biomarcador; estrés oxidativo; glutatión reductasa; jabalí; malondialdehído; riñón

Oxidative stress biomarkers in wild board (*Sus scrofa*) from North-West of the Iberian Peninsula

Abstract: The existence of polluting chemical compounds in the environment is a threat both to living beings and to the ecosystem as a whole. Ecotoxicology is therefore developing new tools, such as the use of biomarkers, with the aim of evaluating the effect of these pollutants. Many studies have discussed the role of oxidative stress indicators as potentially useful parameters in the field of environmental pollution. However, studies focused on wildlife, and more specifically on wild boar (*Sus scrofa*), are scarce, despite the wide geographical distribution of this ungulate, which would allow its use as a bioindicator in environmental biomonitoring programmes. In the present study, the levels of two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde (MDA) and glutathione reductase (GR), were determined in the kidney tissue of wild boar from NW Spain. In addition, the influence of sex on the values obtained was evaluated. The overall mean values were 1.811 ± 0.426 nmoles/mg protein for MDA, and 0.079 ± 0.019 picomol/min/mg protein for GR activity. With regard to the influence of the sex factor, statistically significant differences were found in the levels of MDA, with higher levels of oxidative stress in males than in females. These results constitute a baseline of oxidative stress biomarker levels in game species for use in future biomonitoring studies.

Key words: biomarker; oxidative stress; glutathione reductase; wild boar; malondialdehyde; kidney

Introducción

La contaminación es uno de los problemas más importantes que afecta a día de hoy nuestro planeta y surge como consecuencia de la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o combinación de varios, en cantidad tal, que pueda ocasionar cambios o alteraciones en la salud, se-

guridad o bienestar de la población, en la vida vegetal o animal, y por defecto, en el conjunto del ecosistema. En muchas ocasiones somos los propios seres humanos los causantes de tales cambios, debido al acelerado crecimiento demográfico, por una parte, y al progreso tecnológico por la otra, lo que puede atentar contra el equilibrio biológico de la tierra (Ames et al. 1990). De hecho, actualmente se considera que no existe en todo nuestro

planeta un ecosistema que pueda ser considerado libre de actividad humana, incluso los ecosistemas más aislados presentan niveles significativos de agentes contaminantes debido a las corrientes marinas o los movimientos de masas de aire (Hermoso de Mendoza et al. 2008).

Como consecuencia de esta problemática, surge la necesidad de establecer una serie de medidas que permitan evaluar los riesgos que provocan cada una de las sustancias químicas liberadas en los ecosistemas. Esto conduce a la aparición de la Ecotoxicología, una rama reciente, pero de gran importancia dentro de la Toxicología (Kolf-Clauw et al. 2007) y que es definida por Römbke y Moltmann (1996) como “la ciencia que permite predecir el impacto de los productos químicos sobre los ecosistemas”. Esta ciencia surge por la necesidad de poder evaluar de una manera precisa y objetiva los efectos adversos producidos por las más de 45 000 sustancias químicas sabidas en el medio ambiente, muchas de ellas inocuas, pero algunas otras con un elevado potencial toxicológico debido a diversas reacciones de biotransformación y a sus capacidades de bioacumularse/biomagnificarse en los seres vivos.

Uno de los objetivos de la Ecotoxicología radica en evaluar el estado ambiental en que se encuentran los ecosistemas, cuantificando la concentración de los contaminantes presentes en el suelo, agua o aire, y en la biocenosis. Sin embargo, esta mera cuantificación no aporta valores fiables sobre los efectos de estos agentes potencialmente toxicológicos sobre los seres vivos. Frente a esta limitación, la Ecotoxicología ha recurrido al empleo de métodos basados en la observación cualitativa y/o cuantitativa de organismos vivos para intentar paliar las limitaciones antes mencionadas, desarrollando un proceso de biomonitorización, llamado así por trabajar con organismos vivos, algo que proporciona una gran cantidad de información sobre la relación existente entre los seres vivos y el medio ambiente donde se desarrollan (Kolf-Clauw et al. 2007). Dicha biomonitorización recurre por tanto al empleo de organismos vivos denominados bioindicadores, que por sus características presentan una elevada sensibilidad ante los cambios ambientales, manifestándose mucho antes que en el caso de muestras abióticas tomadas del suelo, agua o aire. Gracias a la utilización de bioindicadores se pueden evaluar con mayor antelación modificaciones físico-químicas en los ecosistemas y, por tanto, llevar a cabo medidas de control y gestión medioambiental efectivas (Capó 2002). Sin embargo, los cambios experimentados por dichos organismos varían en función de la especie elegida, ya que no todas presentan las mismas características, pudiendo esto llevar a errores.

Por otra parte, la relación entre la concentración tisular de un tóxico y la respuesta del organismo es algo complejo, ya que depende de numerosos factores. Para solventarlo, y así poder evaluar no solo la exposición sino también los posibles efectos en el ecosistema, se recurre a los biomarcadores (Gil 2000). Esta herramienta se puede definir como una respuesta biológica observable y/o medible que revela la exposición del organismo a determinados agentes químicos, produciendo efectos tóxicos (Walker et al. 1996). El empleo de biomarcadores proporciona ventajas significativas en comparación con métodos tradiciona-

les de monitoreo, ya que permiten una evaluación más temprana y precisa de los efectos en la salud y del medio ambiente (Griffiths et al. 2002), y dentro de ellos, unos de los más ampliamente utilizados en ecotoxicología debido a su gran sensibilidad son los de estrés oxidativo.

En organismos aeróbicos, el mantenimiento del balance redox es fundamental tanto para las funciones metabólicas vitales como para la integridad celular. Este equilibrio depende del funcionamiento de los mecanismos de defensa antioxidantes que protegen contra las especies reactivas del oxígeno (EROs) como por ejemplo H_2O_2 , O_2^- , y OH^- (Yu 1994). La presencia de xenobióticos (metales pesados, compuestos orgánicos persistentes, entre otros) en el organismo, puede generar una sobreproducción de EROs, lo que origina un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, generando una disminución de estas últimas, y produciendo el fenómeno de estrés oxidativo. Debido a la toxicidad de los radicales libres, previos estudios han comprobado que el estrés oxidativo genera un daño celular alterando la estructura de los lípidos, proteínas y ácidos, lo que se traduce en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, autoinmunitarias, o incluso en cáncer (Armstrong y Stratton 2016). Dentro de los biomarcadores de estrés oxidativo, el malondialdehído (MDA) es un producto secundario de la peroxidación lipídica, el fenómeno más común indicado por las EROs. Este biomarcador es ampliamente utilizado para evaluar los efectos de los contaminantes, por su incremento en el organismo como respuesta frente a la exposición a xenobióticos, y su correlación con la deficiencia de las defensas antioxidantes (Halliwell y Gutteridge 2007). Por otro lado, el glutatión (GSH) constituye el antioxidante más importante y abundante en el organismo, de tal forma que sus niveles pueden indicar una exposición y/o efecto a los más variados agentes contaminantes (Armstrong y Stratton 2016). La producción de antioxidantes tiene lugar principalmente en aquellos órganos cuyo papel es el metabolismo de xenobióticos y la transformación enzimática de las EROs, como son hígado y riñón (Halliwell y Gutteridge 2007). En todo caso, los factores endógenos como la edad o el sexo pueden desempeñar una gran relevancia en la interpretación de los resultados, ya que en función de estos puede variar la absorción, el destino y los efectos de los contaminantes en el organismo (Burger 2007; Neila et al. 2017).

En todo este proceso son de gran relevancia las especies sometidas a actividades cinegéticas, pues en ellas es posible describir las concentraciones de contaminantes presentes en sus tejidos y al mismo tiempo cuantificar diversos biomarcadores. Específicamente, a la hora de seleccionar la especie bioindicadora más adecuada para estos complejos estudios, una de gran utilidad puede ser el jabalí (*Sus scrofa*), ya que presenta una serie de ventajas con respecto al resto. En primer lugar, es una especie de amplia distribución a nivel europeo, no migratoria (aportando información por tanto más ligada a una zona geográfica concreta). Además, es relativamente sencillo la toma de muestras debido a la gran cantidad de ejemplares que son abatidos cada año en actividades cinegéticas y, por tanto, no es necesario sacrificar animales con el único fin de lle-

var a cabo un estudio toxicológico, lo que conllevaría complejas decisiones éticas. Por otra parte, poseen una gran capacidad de acumular contaminantes en órganos internos y, por último, es una especie relativamente longeva, permitiendo estudiar el efecto de los xenobióticos a largo plazo. Además, el 80-90% de su dieta se compone de alimentos recogidos del suelo (bellotas, raíces, etc.) incluso roedores, huevos, o carroña (Schley y Roper 2003; Baubet et al. 2004). Especialmente, esta especie consume lombrices de tierra, en la que se ha evidenciado que acumulan cantidades significativas de metales pesados (Latif et al. 2013). Además, remover los terrones de tierra mientras pastan también desempeña un papel importante en este proceso (Bakowska et al. 2016). En definitiva, su dieta omnívora y su dispersión hacia núcleos urbanos hace que esta especie esté especialmente expuesta a contaminantes, entre los cuales destacan metales pesados y compuestos orgánicos persistentes, como es el caso de los plaguicidas (Tomza-Marciniak et al. 2014; Kalinina et al. 2022).

Con respecto a los estudios de biomonitorización realizados en especies cinegéticas de la Península Ibérica, destacan aquellos en los que se ha llevado a cabo una cuantificación de metales como el mercurio (Hg), plomo (Pb), o cadmio (Cd), en jabalí, ciervo, zorro o corzo (Reglero et al. 2009; Hermoso de Mendoza García et al. 2011; Gallego-Rodríguez 2012; De La Casa-Resino et al. 2014; Pérez-López et al. 2016; Neila et al. 2017). Sin embargo, solo se han descrito dos estudios de biomonitorización referentes a la evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo en jabalíes presentes en zonas contaminadas del sur de la península (Reglero et al. 2009; Rodríguez-Estival et al. 2013), centrándose en niveles de peroxidación lipídica (LPO), glutatión total (GSH) y actividad glutatión peroxidasa (GPx), existiendo un vacío sobre los valores de referencias de este ungulado en zonas no contaminadas, que aporten conocimiento sobre el estado de salud de los ecosistemas mediterráneos.

Con todas estas consideraciones, el objetivo del presente estudio fue evaluar los niveles de distintos biomarcadores de estrés oxidativo, concretamente malondialdehído (MDA) y glutatión reducido (GR) en el tejido renal de jabalíes procedentes del NO de la Península Ibérica. Estos resultados aportarán valores basales que puedan ser empleados en futuros programas de biomonitorización con esta misma especie en otras zonas de la Península Ibérica y del conjunto de la Unión Europea. Además, la comparación los resultados del presente estudio con respecto a otros de naturaleza similar nos proporcionará un indicativo sobre el grado de contaminación al que están expuesto la población de jabalí en zonas no contaminadas, y el riesgo que puede suponer el consumo de su carne en la comunidad de cazadores.

Material y métodos

Muestras biológicas

Los animales empleados para la realización del presente estudio (n=50; 22 hembras, 28 machos) procedieron de batidas de caza controladas y realizadas en la comunidad autónoma de Galicia (NO de la Península Ibérica) (Fig. 1), en zonas eminentemente agrícolas, ganaderas y/o forestales, por tanto, teóricamente alejadas de fuentes relevantes de contaminación. Tras el fin de la actividad cinegética, se extrajeron en la propia zona muestras de riñón (se eligió dicho órgano por sus importantes implicaciones como órgano diana en la acumulación de agentes causantes de daño oxidativo, así como por su relación en los procesos de biotransformación de xenobióticos). Inmediatamente, tras recoger las muestras, se introdujeron en bolsas de plástico herméticas perfectamente identificadas y se congelaron a -80 °C hasta las posteriores manipulaciones. Desde las zonas de recogida, las muestras fueron remitidas perfectamente identificadas y de forma adecuada a la Unidad de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, donde fueron almacenadas hasta la realización de las siguientes manipulaciones.

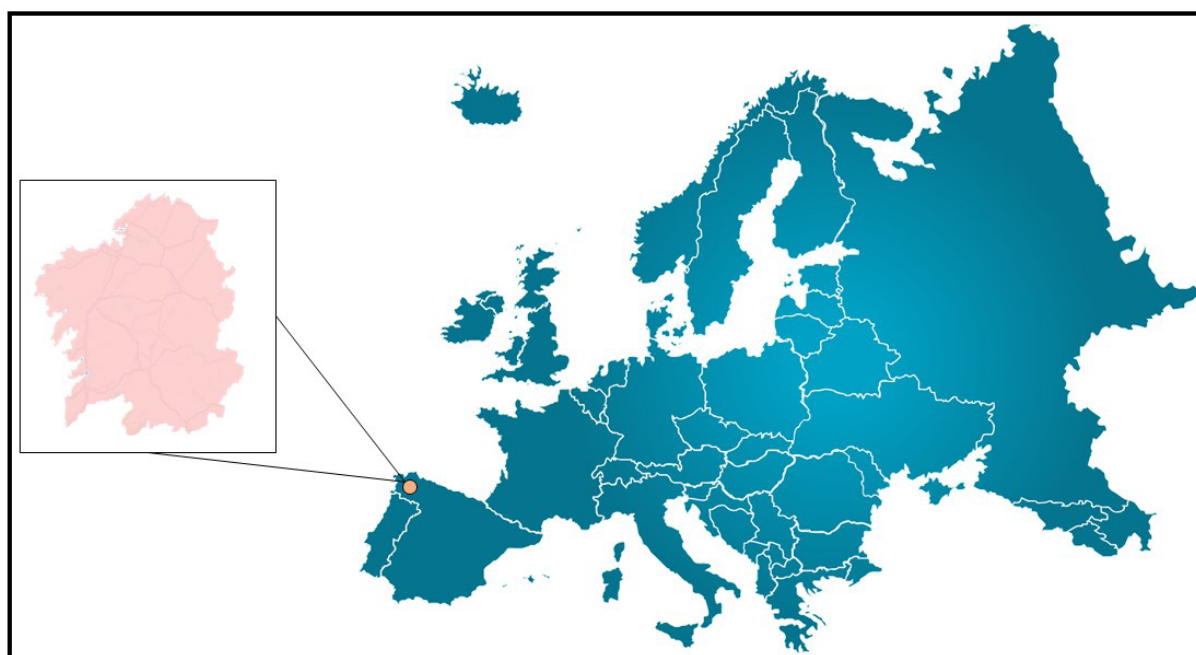


Figura 1. Mapa del lugar donde se tomaron las muestras.

Figure 1. Map of sampling locations

Determinaciones bioquímicas

Antes de realizar las determinaciones bioquímicas posteriormente explicadas, es necesario homogeneizar las muestras de tejido renal. Para ello se empleó un homogeneizador de vástago en la proporción de 5 ml de tampón fosfato pH 7.4 y 0.1 M por cada 0.5 g de muestra. Los homogeneizados de cada una de las muestras obtenidas se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, obteniéndose un sobrenadante que se distribuyó en 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml cada uno que se volvieron a centrifugar a 12 000 rpm durante 20 minutos, recogiendo los sobrenadantes. El primero de ellos se congeló a una temperatura de -80 °C, y será el que posteriormente se utilizará para cuantificar la concentración de proteínas y la actividad glutatión reductasa. Al tubo restante se le añadieron 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 50% para precipitar las proteínas y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se depositó nuevamente en otro tubo Eppendorf, procediendo a su congelación a -80 °C para posteriormente llevar a cabo el análisis de la concentración de malondialdehído (MDA).

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras, se siguió el método propuesto por Bradford (1976). Se basa en el cambio de color que experimenta el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 en presencia de proteínas en medio ácido. Estas proteínas dan lugar a un cambio de la coloración anaranjada del reactivo a una tonalidad azulada, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de proteínas existente en la muestra problema. Por último, se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar para la recta de calibrado.

Para la determinación de la concentración de MDA en las muestras, se utilizó el método propuesto por Recknagel et al. (1982). Se basa en una reacción colorimétrica que detecta los productos de degradación lipídica (MDA y aldehídos) basado en que dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con una molécula de MDA y forman un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 550 nm.

La determinación de la actividad enzimática de la glutatión reductasa se realiza adaptando el protocolo de trabajo propuesto por Cribb et al. (1989). Consta de una reacción colorimétrica que se forma a partir de la muestra a la cual se le ha añadido previamente una mezcla de nicotin-adenin-dinucleótido-fosfato reducido (NADPH), glutatión oxidado (GSSG), y ácido dietileno-triamino-pentaacético (DTPA). Por último, la reacción resultante se midió en una placa multipocillo con ayuda del espectrofotómetro (Biotek, Power Wave 340) y a una longitud de onda 340 nm.

Estudio estadístico

Para la realización del estudio estadístico de los resultados obtenidos relativos a la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en el presente estudio, se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism (versión 7). Para la elección del análisis estadístico de las muestras, se tuvo que establecer primero si los datos presentaban una distribución normal. Para ello se aplicó el test de *Shapiro-Wilk*, cuyos supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos obtenidos no se cumplieron, por lo que se procedió a realizar un estudio estadístico no paramétrico. El estudio aplicado consistió en una prueba de *U de Mann-Whitney*, en el caso de la variable sexo, al existir dos grupos de estudio. Así mismo, se llevó a cabo un análisis de los principales estadísticos descriptivos (media, mediana, máximo, mínimo, desviación estándar y error estándar), relativos a los distintos biomarcadores cuantificados en las muestras de riñón de jabalí (*S. scrofa*) empleadas.

Resultados

En el presente estudio de biomonitorización se evaluaron las concentraciones medias de MDA y GR en el riñón de jabalíes procedentes del NO de la Península Ibérica. Los principales estadísticos descriptivos relacionados con los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo en el riñón de esta especie se muestran en la [Tabla 1](#).

Los niveles medios de MDA fueron expresados en nmoles/mg de proteína, siendo el valor medio de MDA obtenido en riñón del conjunto de la población de jabalíes de 1.811 ± 0.426 nmol/mg de proteína. En cuanto al GR, los niveles medios fueron expresados en picomoles/min/mg de proteína, siendo el valor medio de glutatión reductasa obtenido en riñón del conjunto de la población de jabalíes de 0.079 ± 0.019 picomol/min/mg de proteína.

Por lo que respecta al estudio del efecto del sexo, en la [Figura 2](#) se muestran los valores medios de MDA y GR medidos en el riñón de machos y hembras. Como se aprecia en la figura, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos ($p < 0.05$), siendo los valores medios de MDA en hembras (0.917 ± 0.310 nmoles/mg de proteína) significativamente inferiores a los encontrados en machos (2.542 ± 0.702 nmoles/mg de proteína). Sin embargo, para el GR no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos. No obstante, los niveles medios siguieron una tendencia similar, siendo inferiores en las hembras (0.065 ± 0.031 picomoles/min/mg de proteína) con respecto a los machos (0.090 ± 0.024 picomoles/min/mg de proteína).

Tabla 1. Principales estadísticos descriptivos relativos a los niveles de MDA (nmol/mg de proteína) y GR (picomol/min/mg de proteína) en riñón de jabalí (n=50).

Tabla 1. Main descriptive statistics related to MDA (nmol/mg of protein) y GR (picomol/min/mg of protein) in wild boar kidney (n=50).

	Media	Error típico	Mínimo	Máximo	Mediana
MDA	1.811	0.426	0.102	9.994	0.510
GR	0.079	0.019	0.007	0.456	0.024

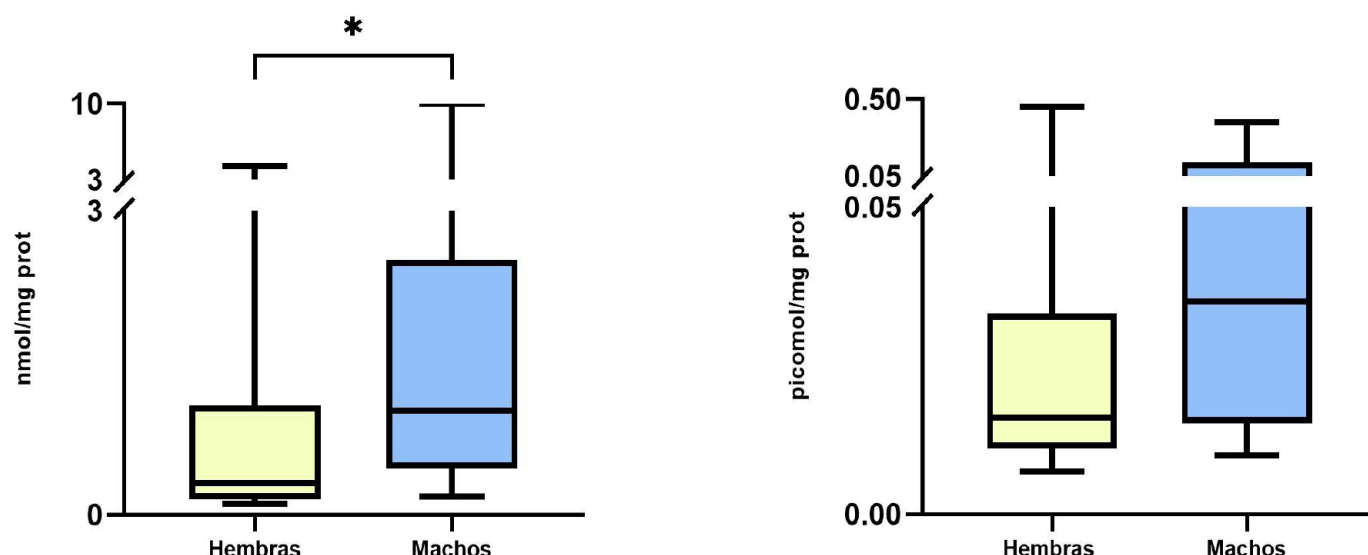


Figura 2. Niveles de MDA y GR en riñón de jabalí en función del sexo de los animales muestreados. Las cajas muestran los percentiles al 10%, 25%, 50% (mediana), 75% y 90%. *Indica un p-valor inferior a 0.05.

Figure 2. MDA and GR levels in wild boar kidney depending on the sex of the sampled animals. The boxes show the percentiles at 10%, 25%, 50% (median), 75%, and 90%. *Indicates a p-value less than 0.05.

Discusión

La activación de los mecanismos de defensa antioxidante de un organismo depende del medio ambiente y es el resultado de muchos factores, entre los que destaca la contaminación ambiental. Determinar los niveles medios de biomarcadores de estrés oxidativo en el tejido renal de jabalíes permite evaluar el grado de contaminación al que pueden estar sometidos y extrapolar la presencia de contaminantes en los hábitats naturales, que estén afectando al estado de salud del ecosistema. La literatura científica acerca de biomarcadores de estrés oxidativo, concretamente MDA y GR, en el jabalí es muy escasa. Únicamente destaca el estudio realizado por Šuran et al. (2013) en jabalíes procedente de Croacia, donde se evaluaron los niveles de MDA en diversos tejidos, entre ellos el riñón, cuyos valores fueron inferiores a los obtenidos en el presente estudio. Hay que destacar que este autor observó correlaciones positivas entre los niveles de Cd y Pb con los del MDA en el tejido renal, por lo que se evidencia que la presencia de un agente tóxico en el organismo estaría asociado a un incremento del MDA y, por consiguiente, contribuye al estrés oxidativo. Por otro lado, a diferencia del presente estudio, otros autores han evaluado la peroxidación lipídica a través de la medida con ácido tiobarbitúrico (TBARS). Por ejemplo, Reglero et al. (2009) estudiaron en jabalíes procedente de zonas mineras del sur de la Península Ibérica la peroxidación lipídica en el tejido hepático, no observando incremento alguno. La justificación que aporta el autor a sus resultados es la excreción del Pb a través de la intervención de antioxidantes. Otro estudio más reciente en la misma zona altamente contaminada no observó diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de TBARS en el bazo de jabalíes procedentes de la zona control con respecto a la zona minera (Rodríguez-Estival et al. 2013).

Comparando los resultados del presente estudio con otros realizados en diferentes especies (cinegéticas o no) destaca el

llevado a cabo en cerdos domésticos (*Sus scrofa domestica*) analizando el efecto antioxidante de *Lactobacillus fermentum* (Wang et al. 2009), y donde observaron unos valores medios de MDA en riñón de cerdo de 4.44 ± 0.43 nmoles/mg de proteína, superiores a los hallados en los jabalíes del presente estudio. Sin embargo, en el trabajo de Rodríguez-Estival et al. (2011) se muestran unos resultados de MDA de 0.19 ± 0.01 nmoles/mg de proteína en riñón de ciervo rojo (*Cervus elaphus*), inferiores a los de nuestro estudio. Algo similar se observa en el trabajo llevado a cabo por De la Casa (2010), basado en un estudio de biomarcadores de contaminación en Ecotoxicología en el que se utilizó el corzo (*Capreolus capreolus*) como bioindicador, obteniéndose un valor medio de MDA de 0.212 ± 0.014 nmoles/mg de proteína en riñón. Raza et al. (1997) cuantificaron unos valores de peroxidación lipídica en riñón de camellos y ratas inferiores a los de nuestro estudio. Algo similar ocurre en otro estudio llevado a cabo por Keskin et al. (2005) en riñón de conejo. Laguna (2009) obtuvo un valor medio de MDA en riñón de zorro rojo (*Vulpes vulpes*) de 0.47 ± 0.19 nmoles/mg de proteína. Jaime et al. (2007) llevaron a cabo un estudio para determinar qué parámetros de estrés oxidativo eran más adecuados para cada sustancia química a la que se ha estado expuesto, hallando que el MDA es un buen biomarcador en la práctica totalidad de las sustancias químicas tóxicas. A la vista del valor de MDA obtenido en el tejido renal de jabalíes, parece confirmarse que estos individuos estar sometidos a un estrés oxidativo, ya sea por la exposición a contaminantes, o otras condiciones estresantes, como por ejemplo cambios en las condiciones ambientales o disponibilidad del alimento, lo que subraya la necesidad de investigar más a fondo las posibles causas, y con ello la medida de contaminantes.

Con respecto a los niveles de GR, no hay valores de referencias de estudios de biomonitorización previos a los del presente estudio. A pesar de que la forma reducida del glutatión y sus enzimas asociadas se consideran los biomarcadores más

fiabiles del estrés oxidativo, la mayoría de la literatura científica se centra en la determinación del glutatión total (GSH) (Isaksson 2010). De forma general, se sabe que los elementos tóxicos inhiben la actividad de las enzimas antioxidantes y causan peroxidación lipídica (Casalino et al. 2002). Estudios previos han revelado cambios en la actividad antioxidante en respuesta al estrés oxidativo inducido por metales como por ejemplo el Cd o el Pb. Rodríguez-Estival et al. (2011) encontraron un aumento en el contenido de GSH en el hígado de jabalíes de una zona altamente contaminada, lo que puede sugerir que la síntesis de GSH estaba siendo inducida por el estrés oxidativo causado por el Pb. Así, Kalinina et al. (2022) también observaron correlaciones entre los niveles de GSH y elementos metálicos en diferentes tejidos de jabalíes del noroeste de Rusia, entre ellos el riñón. Además, los resultados de estos autores con respecto a los niveles de antioxidante y de contaminantes, mostraron que el riñón del jabalí no es apto para consumo humano, ya que suponía un gran riesgo para la salud. Reglero et al. (2009) reportó niveles de GSH en el hígado de jabalíes procedente de zonas mineras contaminadas del sur de España, y observó que estos niveles fueron significativamente bajos con respecto a la zona control. Sin embargo, este autor justificó estos resultados al papel propuesto del GSH en la excreción activa de Pb a través de la bilis, hecho respaldado por la evidencia experimental de que se produce una menor acumulación de Pb en los tejidos cuando se suministran aminoácidos precursores del GSH a los animales.

Debido a la escasez de trabajos sobre especies cinegéticas, se ha considerado adecuado recoger otros estudios de biomonitorización pero en humanos. Tal es el caso del estudio llevado a cabo por Georgieva et al. (2002) a trabajadores de una planta de tratamiento biológico de aguas residuales. Los valores plasmáticos de GR fueron de 3.93 ± 1.23 nmol/l en los trabajadores expuestos y de 5.97 ± 0.9 nmol/l en el grupo de control. Acto seguido se realizó una suplementación con antioxidantes a todos los trabajadores obteniéndose unos resultados de 5.23 ± 1.33 nmol/l tras la suplementación, concluyendo que la alteración de la actividad GR provocaría una disminución según Cisneros-Prego (1995) en las concentraciones de glutatión reducido, GSH, dando lugar a un aumento en los niveles de las peligrosas especies reactivas de oxígeno y desencadenando varios procesos patológicos como cáncer, diabetes mellitus o úlcera péptica.

Jaime et al. (2007) llevaron a cabo una revisión bibliográfica con el objetivo de determinar qué parámetros de estrés oxidativo son más adecuados para cada sustancia química a la que se ha estado expuesto, apareciendo la actividad de la enzima GR junto con el MDA y la glutatión peroxidasa (no considerada en el presente estudio) como biomarcadores de elección a la hora de evaluar los niveles de contaminantes petroquímicos y sus efectos en los seres vivos.

Garçon et al. (2004) midieron los niveles de plomo (Pb) y cadmio (Cd) a trabajadores de una fundición de metales, utilizando dichos niveles como marcadores urinarios de nefrotoxicidad. Se establecieron relaciones entre los marcadores de estrés oxidativo (MDA y GR) y los niveles de exposición por un lado, y entre los marcadores urinarios de nefrotoxicidad y el tiempo

de exposición a dichos metales pesados por otro. Dicho estudio concluyó que los cambios en los marcadores de nefrotoxicidad están estrechamente correlacionados con los niveles de exposición al Pb y Cd, mostrando dichos trabajadores unos niveles de exposición moderados.

Abd Ellah et al. (2008) determinaron los niveles de actividad GR realizando biopsias hepáticas tras la administración de una dosis constante de etionina (antimetabolito y antagonista de la metionina, que interfiere en la incorporación de aminoácidos en las proteínas, así como en la utilización del ATP celular). Para ello, emplearon un total de 7 vacas de raza Holstein (2 pertenecientes al grupo control y 5 al grupo experimental) obteniendo unos resultados en el grupo control de 9.94 U/g proteína el día cero, 8.73 U/g proteína el día cuatro, 10.27 U/g proteína el día siete y 8.86 U/g proteína el día diez. El grupo experimental obtuvo unos resultados de 8.20 ± 1.71 U/g proteína el día cero, 11.55 ± 2.13 U/g proteína el día cuatro, 20.24 ± 5.23 U/g proteína el día siete y 14.45 ± 1.83 U/g proteína el día diez existiendo diferencias estadísticamente significativas en el día cuatro ($P < 0.05$) y muy significativas ($P < 0.01$) en los días siete y diez y concluyendo que la determinación de los niveles de GR en hígado es una herramienta muy valiosa para detectar estrés oxidativo y disfunción hepática.

Efecto del sexo

En cuanto a la influencia de factores endógenos en la producción de antioxidantes y estrés oxidativo, la mayoría de ellos se han centrado en la edad (Šuran et al. 2013), siendo escasos los estudios que consideran el factor endógeno sexo. En el presente caso concreto, el hecho de que los machos hayan tenido unos valores medios de MDA significativamente superiores a los de las hembras puede atribuirse a razones fisiológicas como consecuencia de las diferencias entre ambos sexos en lo que respecta al estado hormonal y reproductor, expresión genética, o tasa metabólicas (Burger et al. 2007; Neila et al. 2017). Además, la diferencia en el comportamiento de jabalíes entre machos y hembras también puede influir en la activación de los antioxidantes y, en definitiva, el estrés oxidativo. Las diferencias en el tamaño del área de campeo es dependiente del sexo, ya que los grupos de hembras junto con sus crías tienen un área de campeo relativamente constante de unas 250 ha, mientras que los machos viven en solitario sin un territorio estable y migran muchos kilómetros (Tataruch y Kierdorf 2003).

Los pocos estudios previos llevados a cabo en jabalíes no han observado influencia alguna del sexo sobre los niveles de antioxidantes tanto en el tejido renal como en el hepático (Tomza-Marciniak et al. 2014; Kalinina et al. 2022). Sin embargo, con respecto a otras especies, Reglero et al. (2009) observaron que los niveles de TBARS relacionados con la peroxidación lipídica fueron significativamente más elevados en los hígados de ciervos macho con respecto a las hembras. En el estudio llevado a cabo por De la Casa (2010, datos sin publicar) en riñón de corzo, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en ambos sexos, siendo los valores en riñón de machos y hembras de 0.212 ± 0.020 y 0.213 ± 0.020 nmoles/mg de proteína,

respectivamente, al contrario de nuestro estudio en el que se cuantificaron valores muy distintos en función del sexo, siendo mayor en machos que en hembras. En el estudio de Ruiz-Larrea et al. (1994), se ha evaluado el potencial antioxidante de distintas hormonas esteroideas como el estradiol, progesterona o testosterona y se ha observado que el estradiol es antioxidante natural, mientras que otros esteroides no presentan una actividad antioxidante significativa. Este hecho también podría explicar que los valores de MDA sean inferiores en las hembras, mostrando en todo caso la relevancia de considerar este factor endógeno en futuros estudios ambientales. Este hecho puede apreciarse también en un estudio llevado a cabo por Barp et al. (2002), en el cual se compararon los niveles de MDA en ratas Wistar castradas y sin castrar, de ambos sexos. Antes de la castración, las hembras presentaron menor concentración de MDA en tejido cardíaco con respecto a los machos. Estos niveles aumentaron un 200% tras la castración de las hembras, mientras que los machos no sufrieron cambios tras la misma. Estos resultados confirman lo dicho anteriormente por Ruiz-Larrea et al. (1994), desempeñando los estrógenos un importante papel como antioxidantes naturales, minimizando el daño de la membrana lipídica. Está ampliamente documentado el incremento significativo de MDA en los tejidos de ratas expuestas a distintos contaminantes, principalmente pesticidas organofosforados (Abdollahi et al. 2004; Altuntas et al. 2004). Otros autores como Fidan et al. (2007) han correlacionado el incremento de los niveles de metales pesados con el aumento de las concentraciones de MDA en diferentes especies. Jaime et al. (2007) llevaron a cabo un estudio para determinar qué parámetros de estrés oxidativo son más adecuados para cada sustancia química a la que se ha estado expuesto, hallando que el MDA es un buen biomarcador en la práctica totalidad de las sustancias químicas (metales pesados - plomo, cromo, aluminio, cobalto, cadmio, mercurio, etc.-, plaguicidas, petroquímicos...).

En cuanto a la influencia del sexo en los niveles de GR, el hecho de que los machos hayan obtenido un nivel medio mayor al de las hembras puede atribuirse a que este biomarcador es un antioxidante enzimático importante en la reproducción de los machos. La GR es una flavoproteína dimérica que mantiene la homeostasis del GSH, al reducir el GSSG -la forma oxidada del glutatión- de nuevo a GSH, la forma reducida, con la ayuda de un cofactor reductor, el NADPH. Se encuentra principalmente en las células de Sertoli del testículo. Estas necesitan GR para que la suplementación con glutatión de las células espermatogénicas tenga éxito, lo que indica la importancia de este antioxidante enzimático. Además, la GR en el tracto epitelial actúa como antioxidante para proteger los ácidos grasos insaturados de la peroxidación lipídica durante la maduración (Armstrong y Stratton 2016). No se han encontrado estudios previos que aborden específicamente los niveles de este biomarcador en el tejido renal de jabalí. Los estudios existentes se centran principalmente en la concentración de glutatión reducido (GSH). Por un lado, algunos autores no han encontrado influencia alguna de este factor en la actividad del antioxidante (Kalinina et al. 2022). No obstante, otros autores como Rodríguez-Estival et al. (2013), si

que observaron influencia, de tal forma que los jabalíes machos tuvieron una disminución del GSH más elevada que las hembras. Al considerar otras especies, los trabajos llevados a cabo por Garçon et al. (2004), Jaime et al. (2007) y Abd Ellah et al. (2008) sobre determinación de la actividad GR no mostraron sin embargo distinción en función del género. Únicamente en el estudio llevado a cabo por Georgieva et al. (2002) a trabajadores de una planta de tratamiento biológico de aguas residuales aparece distinción en cuanto al sexo. En él, hay un grupo de trabajadores expuestos compuesto por catorce mujeres y cincuenta y cinco hombres y un grupo control compuesto por siete mujeres y veintitrés hombres. Pero a la hora de exponer los resultados se incluyen tanto hombres como mujeres en el mismo grupo, obviando un factor que seguramente habría aportado información adicional de primera magnitud.

Se ha localizado además un estudio sobre la influencia del transporte por carretera en las actividades GR, llevado a cabo por Niedźwiedz et al. (2012) sobre sesenta caballos, y donde se obtuvieron unos valores en eritrocitos de 54 ± 28 U/g de hemoglobina antes de llevar a cabo ningún tipo de transporte, 40 ± 23 U/g de hemoglobina tras ocho horas de viaje y 50 ± 27 U/g de hemoglobina tras 24 horas de descanso del transporte anterior, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre la medición antes del transporte y tras las ocho horas de viaje. Dicho estudio concluyó que el transporte por carretera tendría un impacto en la actividad de las enzimas antioxidantes GR, recuperando los valores normales de dicha enzima tras un descanso de 24 horas de viaje y que la disminución de la actividad de tal enzima puede aumentar la susceptibilidad de los animales a infecciones tras el transporte.

Conclusiones

En el presente estudio se han establecido los niveles basales de distintos biomarcadores de estrés oxidativo en el tejido renal de jabalíes del NO de España, así como la influencia del factor sexo en la cuantificación de éstos. Los niveles más altos de estos parámetros se dieron para el MDA, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre hembras y machos. Estos resultados deberían tenerse en cuenta en futuros estudios de biomonitorización en especies de caza mayor, con el fin de determinar si los cambios de dichos biomarcadores podrían estar asociados o no a un aumento de los niveles de contaminación ambiental. Además, es necesario realizar un seguimiento continuo de la salud y el bienestar de la fauna silvestre en esta área específica con la finalidad de obtener más conocimiento sobre el estado de salud de los ecosistemas afectados. Estos resultados pueden ayudar en la identificación temprana de problemas ambientales y en la implementación de medidas de gestión adecuadas, así como promover la adopción de prácticas más sostenibles, el control de la contaminación y la conservación de nuestros ecosistemas únicos. En definitiva, es fundamental la medida o seguimiento del estado de salud de estos ecosistemas con el fin de prevenir futuros episodios de contaminación que puedan conllevar pérdidas irreparables, y garantizar que las futuras generaciones disfruten de la magnífica riqueza de nuestra región.

Contribución de los autores

Javier García-Muñoz: Redacción – revisión y edición, Visualización. Ángel Portillo-Moreno: Redacción – borrador original, Investigación. Juan Carlos Solomando González: Análisis bioquímico. Salomé Martínez-Morcillo: Metodología, Validación. María Prado Míguez-Santiyán: Análisis formal, Recursos. Francisco Soler-Rodríguez: Software, Validación. Ana López-Beceiro: Metodología, Recursos. Luis Eusebio Fidalgo-Álvarez: Metodología, Recursos. Marcos Pérez-López: Administración del proyecto, Conceptualización, Supervisión.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los centros de Recuperación de Fauna Salvaje de Galicia y a la Dirección Xeral de Patrimonio Natural (Consellería de Medio Ambiente y Ordenación do Territorio) de la Xunta de Galicia, por autorizar el uso y traslado de ejemplares de fauna empleados en el presente trabajo. Este trabajo ha sido posible gracias al Fondo Europeo de Desarrollo Regional (ERDF) y a la Junta de Extremadura (GR21118).

Referencias

- Abd Ellah, M.R., Okada, K., Goryo, M., Kobayashi, S., Oishi, A., Yasuda, J. 2008. Total glutathione and glutathione reductase in bovine erythrocytes and liver biopsy. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(8), 861-864.
- Abdollahi, M., Mostafalou, S., Pournourmohammadi, S., Shadnia, S. 2004. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 137(1), 29-34.
- Altuntas, I., Kilinc, I., Orhan, H., Demirel, R., Koylu, H., Delibas, N. 2004. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro. *Human & Experimental Toxicology*, 23(1), 9-13.
- Ames, B.N., Profet, M., Gold, L.S. 1990. Dietary pesticides (99.99% all natural). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7777-7781.
- Armstrong, D., Stratton, R.D. (Eds.). 2016. Oxidative stress and antioxidant protection: The science of free radical biology and disease. John Wiley and Sons.
- Barp, J., Araújo, A.S.D.R., Fernandes, T.R.G., Rigatto, K.V., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Singal, P. 2002. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 1075-1081.
- Baubet, E.R.I.C., Bonenfant, C., Brandt, S. 2004. Diet of the wild boar in the French Alps. *Galemys*, 16(especial), 101-113.
- Bąkowska, M., Pilarczyk, B., Tomza-Marciniak, A., Udała, J., Pilarczyk, R. 2016. The bioaccumulation of lead in the organs of roe deer (*Capreolus capreolus* L.), red deer (*Cervus elaphus* L.), and wild boar (*Sus scrofa* L.) from Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 14373-14382.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Burger, J. 2007. A framework and methods for incorporating gender-related issues in wildlife risk assessment: gender-related differences in metal levels and other contaminants as a case study. *Environmental Research*, 104(1), 153-162.
- Casalino, E., Calzaretto, G., Sblano, C., Landriscina, C. 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 179(1-2), 37-50.
- Capó, M.A. 2002. *Principios de Ecotoxicología. Diagnóstico, tratamiento y gestión del medioambiente*. McGraw-Hill Profesional. Madrid, España.
- Cisneros-Prego, E. 1995. La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14(1): 0-0.
- Cribb, I., García, L.M., Gilhermino, L. 1989. Sea-urchin (*Paracentrotus lividus*) glutathione S-transferases and cholinesterase activities as biomarkers of environmental contamination. *Journal of Environmental Monitoring*, 7: 288-294.
- De la Casa-Resino, I., Hernández-Moreno, D., López-Beceiro, A., Rigueira, L., Míguez, M.P., Pérez-López, M., Fidalgo, L.E. 2014. The effect of gender on several biochemical parameters in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Wildlife Biology in Practice*, 10(2), 51-61.
- Fidan, A.F., Cigerci, I.H., Konuk, M., Kucukkurt, I., Aslan, R., Dunar, Y. 2007. Determination of some heavy metal levels and oxidative status in *Carassius carassius* L., 1785 from Eber Lake. *Environmental Monitoring and Assessment*, 14: 35-41.
- Gallego-Rodríguez, M.E. 2012. Evaluación de la contaminación por plomo y cadmio en ciervo y jabalí en Extremadura. Universidad de Extremadura. Tesis Doctoral.
- García, M.H.D.M., Moreno, D.H., Rodríguez, F.S., Beceiro, A.L., Álvarez, L.E.F., López, M.P. 2011. Sex- and age-dependent accumulation of heavy metals (Cd, Pb and Zn) in liver, kidney and muscle of roe deer (*Capreolus capreolus*) from NW Spain. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 46(2), 109-116.
- Garçon, G., Leleu, B., Zerimech, F., Marez, T., Haguenoer, J.M., Furon, D., Shirali, P. 2004. Biologic markers of oxidative stress and nephrotoxicity as studied in biomonitoring of adverse effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 1180-1186.
- Georgieva, T., Michailova, A., Panev, T., Popov, T. 2002. Possibilities to control the health risk of petrochemical workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 75, 21-26.
- Gil, F. 2000. El papel de los biomarcadores en Toxicología humana. *Revista de Toxicología*, 17(1): 19-26.
- Griffiths, H.R., Møller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., Cooke, M., et al. 2002. Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1-3), 101-208.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free radicals in Biology and Medicine (4th edition)*. Ed. Clarendon, Oxford, Reino Unido.
- Hermoso de Mendoza García, M.H., Rodríguez, F.S., López, M.P. 2008. Los mamíferos salvajes terrestres como bioindicadores: nuevos avances en Ecotoxicología/Wild terrestrial mammals as bioindicators: new advances in Ecotoxicology. *Observatorio Medioambiental*, 11, 37.
- Hermoso de Mendoza, M., Hernández, D., Soler, F., López-Beceiro, A., Fidalgo, L.E., Pérez-López, M. 2011. Sex- and age-dependent accumulation of heavy metals (Cd, Pb y Zn) in liver, kidney and muscle of Roe deer (*Capreolus capreolus*) from NW Spain. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 46: 109-116.
- Isaksson, C. 2010. Pollution and its impact on wild animals: a meta-analysis on oxidative stress. *EcoHealth*, 7(3), 342-350.
- Jaime, A., González, R.M., Díaz, H. 2007. Estrés oxidativo asociado a la exposición ocupacional a sustancias químicas. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*, 8: 52-57.
- Kalinina, S., Panchenko, D., Ilyukha, V., Canfield, A., Baishnikova, I., Antonova, E., Nikerova, K. 2022. Elements and antioxidants in wild boar from northwestern Russia. *European Journal of Wildlife Research*, 68(2), 22.
- Keskin, E., Oztekin, E., Coli, R., Sivrikaya, A., Uney, K., Yazar, E. 2005. Effect of pentoxifylline on antioxidant status of healthy and endotoxemic New Zealand White rabbits. *Acta Veterinaria Brunensis*, 74: 17-21.
- Kolf-Clauw, M., Guenín, A., Pérez-López, M. 2007. Micromamíferos y metales pesados: Biomonitorización del medio ambiente. *Observatorio Medioambiental*, 10: 19-37.
- Laguna, I. 2009. Importancia del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) como bioindicador de contaminación ambiental. Universidad de Extremadura. Trabajo de Grado.
- Latif, R., Malek, M., Mirmonsef, H. 2013. Cadmium and lead accumulation in three endogeic earthworm species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90, 456-459.

- Neila, C., Hernández-Moreno, D., Fidalgo, L.E., López-Beceiro, A., Soler, F., Pérez-López, M. 2017. Does gender influence the levels of heavy metals in liver of wild boar?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140, 24–29.
- Niedźwiedź, A., Nicpoń, J., Zawadzki, M., Służewska-Niedźwiedź, M., Januszewska, L. 2012. The influence of road transport on the activities of glutathione reductase, glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase in equine erythrocytes. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(1), 123–126.
- Pérez-López, M., Rodríguez, F.S., Hernández-Moreno, D., Rigueira, L., Fidalgo, L.E., Beceiro, A.L. 2016. Bioaccumulation of cadmium, lead and zinc in liver and kidney of red fox (*Vulpes vulpes*) from NW Spain: influence of gender and age. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 98(1), 109–117.
- Raza, H., Lakhani, M.S., Ahmed, I., John, A., Morgenstern, R., Montague, W. 1997. Tissue specific expression of glutathione S-transferases, glutathione content and lipid peroxidation in camel tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(4), 829–835.
- Recknagel, R.O., Glende, E.A., Walker, R.L., Lowery, K. 1982. Lipid peroxidation biochemistry measurement and significance in liver cell injury. En: Plaa, G., Hewitt, W.R., (Eds.). *Toxicology of the Liver*, pp. 218–232, Taylor and Francis, Washington DC, Estados Unidos.
- Reglero, M.M., Taggart, M.A., Monsalve-Gonzalez, L., Mateo, R. 2009. Heavy metal exposure in large game from a lead mining area: effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver. *Environmental Pollution*, 157(4), 1388–1395.
- Rodríguez-Estival, J., Martínez-Haro, M., Monsalve-González, L., Mateo, R. 2011. Interactions between endogenous and dietary antioxidants against Pb-induced oxidative stress in wild ungulates from a Pb polluted mining area. *Science of the Total Environment*, 409(14), 2725–2733.
- Rodríguez-Estival, J., de la Lastra, J.M., Ortiz-Santaliestra, M.E., Vidal, D., Mateo, R. 2013. Expression of immunoregulatory genes and its relationship to lead exposure and lead-mediated oxidative stress in wild ungulates from an abandoned mining area. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(4), 876–883.
- Römbke, J., Moltmann, J.F. 1996. Applied Ecotoxicology. Boca Raton: CRC Lewis.
- Ruiz-Larrea, M.B., Leal, A.M., Liza, M., Lacort, M., de Groot, H. 1994. Antioxidant effects of estradiol and 2-hydroxyestradiol on iron-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Steroids*, 59(6), 383–388.
- Schley, L., Roper, T.J. 2003. Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. *Mammal Review*, 33(1), 43–56.
- Šuran, J., Prišč, M., Rašić, D., Srebočan, E., Crnić, A.P. 2013. Malondialdehyde and heavy metal concentrations in tissues of wild boar (*Sus scrofa* L.) from central Croatia. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 48(2), 147–152.
- Tataruch, F., Kierdorf, H. 2003. Mammals as biomonitors. En: Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (Eds.), *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, Vol. 6, pp. 737–772. Elsevier.
- Tomza-Marciniak, A., Marciniak, A., Pilarczyk, B., Drozd, R., Ligocki, M., Prokulewicz, A. 2014. Wild boar (*Sus scrofa*) as a bioindicator of organochlorine compound contamination in terrestrial ecosystems of West Pomerania Province, NW Poland. *Environmental monitoring and assessment*, 186, 229–238.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. 1996. Biomarkers. En: Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. (Eds.). *Principles of Ecotoxicology*, pp. 175–194. Taylor and Francis. Londres, Reino Unido.
- Wang, A.N., Yi, X.W., Yu, H.F., Dong, B., Qiao, S.Y. 2009. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* in vitro and its antioxidative effect on growing–finishing pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1140–1148.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1), 139–162.

