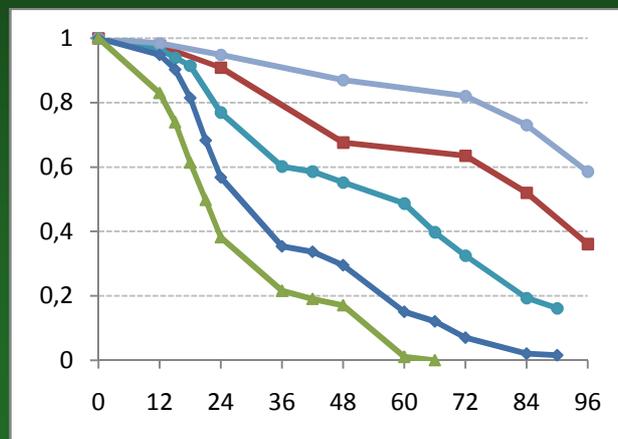
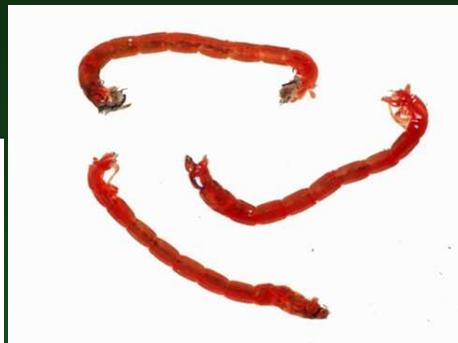
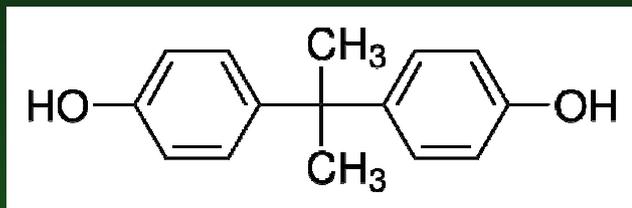


ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE CHIRONOMUS RIPARIUS EXPUESTO AL DISRUPTOR ENDOCRINO BPA (BISFENOL-A)



M. Josune Urien Crespo

Máster Oficial en Física Médica. UNED.

AGRADECIMIENTOS:

A Mónica Morales, por su paciencia infinita, ánimos, interés y dedicación. Por enseñarme a mirar (y ver) con ojos de bióloga y contagiarme su pasión por la Biología.

A Daniel Rodríguez por su interés y por ayudar sin presionar con los aspectos más teóricos, e incluso con mis despistes.

Al Departamento de Física Matemática y de Fluidos por haberme dado esta oportunidad y, en especial, al Grupo de Biología y Toxicología ambiental, por haber admitido a una física “intrusa” y haberla aceptado como una más en todos los aspectos, desde el más serio al más mundano.

A Ugaitz Urien por su apoyo informático... y logístico.

A Rodrigo Gil Merino y Javier Coronel, compañeros del Máster, por sus ánimos y comentarios.

INDICE

Resumen- Abstract.....	4
1. Introducción	
1.1. Análisis de supervivencia.....	6
1.2. Chironomus riparius	7
1.3. Bisfenol A (BPA)	
1.3.1. Estructura.....	8
1.3.2. Presencia en el entorno.....	9
1.3.3. Efectos.....	9
2. Materiales y métodos	
2.1. Cultivo de larvas	10
2.2. Bioensayo de supervivencia.....	10
2.3. Métodos estadísticos de análisis de supervivencia	
2.3.1. Modelos paramétricos. Método de regresión de Gehan y Siddiqui.....	11
2.3.2. Modelos biológicos. DEBtox	
2.3.2.1. Teoría DEB.....	13
2.3.2.2. Modelo de supervivencia.....	13
2.3.2.3. Estimación de parámetros.....	15
2.3.3. Soporte informático.....	16
3. Resultados	
3.1. Modelos paramétricos. Método de Gehan y Siddiqui modificado	16
3.2. Modelos biológicos. DEBtox.....	18
3.3. Ajuste a una distribución suma de dos Weibull.....	19
4. Discusión	
4.1. Comparación de los ajustes.....	20
4.2. Método de Gehan y Siddiqui modificado.....	22
4.3. Modelo biológico DEBtox.....	22
4.4. Combinación de dos distribuciones tipo Weibull.....	24
4.5. Efecto del tamaño de la larva en el caso de 4.5 mg/l.....	26
5. Conclusiones.....	28
6. Trabajos futuros.....	29
Referencias.....	31

RESUMEN

Chironomus riparius es un invertebrado béntico utilizado como bioindicador en ensayos toxicológicos, proporcionando datos relevantes sobre el estado de contaminación de ríos y acuíferos. Las dos razones principales para su utilización son su desarrollo larvario en los sedimentos, zona habitual de acumulación de tóxicos, y su papel relevante en la cadena trófica y por tanto en la bioacumulación de los tóxicos en el ecosistema.

El Bisfenol A (BPA) es un tóxico presente principalmente en plásticos cuyos efectos como disruptor endocrino han sido ampliamente documentados en vertebrados a niveles muy por debajo de los permitidos. En humanos se ha encontrado BPA en tejidos y orina, y su presencia en envases en contacto con los alimentos ha generado gran controversia.

En el presente estudio se realizaron tests de toxicidad del *Chironomus riparius* en BPA a diferentes concentraciones y tiempos, y se analizó la supervivencia ajustándola por dos métodos de modelos paramétricos (Gehan Siddiqui y ajuste por mínimos cuadrados) y mediante el modelo biológico de la teoría DEB (Dynamic Energy Budget).

Cada uno de ellos reveló tanto ventajas como carencias de diferentes tipos, lo que sugiere la necesidad de investigar nuevos modelos biológicos y toxicocinéticos adaptados al *Chironomus riparius* y sus singulares características.

ABSTRACT

Chironomus riparius is a benthic invertebrate, often used as bioindicator in toxicological assays, providing relevant data on the state of pollution of rivers and aquifers. There are two main reasons for its use: its larval development in sediments, which usually is an area of pollutant accumulation, and its role in the food chain and therefore bioaccumulation of toxins in the ecosystem.

Bisphenol A (BPA) is a chemical present mainly in plastics, and its endocrine disrupting effects have been extensively documented in vertebrates at levels well below the allowable. In humans, BPA has been found in tissues and urine and their presence in packaging in contact with food has generated much controversy.

In the present study toxicity tests of *Chironomus riparius* in BPA were made at different concentrations and times, and survival analysis was adjusted by two parametric modeling methods (Gehan - Siddiqui and least squares) and by the biological model of the DEB theory (Dynamic Energy Budget).

Each of them revealed both advantages and shortcomings of different types, which suggests the need of further investigation in new biological and toxicokinetic models, adapted to the unique characteristics of *Chironomus riparius*.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo económico de los países del primer mundo lleva asociado un aumento constante de la lista de tóxicos utilizados en la industria, así como de las cantidades vertidas al medio.

Los ecosistemas acuáticos son habitualmente los más afectados, tanto por vertidos directos como por filtraciones a partir de aguas de regadío, aguas residuales o lixiviados procedentes de vertederos. A la vez son una pieza clave en la preservación del entorno natural, por un lado porque el agua es imprescindible para los seres vivos, que dependen de su disponibilidad y calidad, y por otro lado porque esa dependencia provoca que el daño originado por la contaminación se extienda mucho más allá de los organismos acuáticos.

La bioacumulación de algunos tóxicos en los seres vivos causa su propagación a lo largo de las cadenas tróficas, llegando incluso hasta los seres humanos a través de la alimentación.

De este modo, los efectos de los compuestos tóxicos pueden llegarnos por contacto directo con productos que los contengan o a través de la cadena alimentaria. La legislación ha de ser revisada constantemente, en la medida en que nuevos productos potencialmente peligrosos salen al mercado, o se encuentran nuevas evidencias de toxicidad en sustancias hasta la fecha consideradas inocuas a las dosis permitidas.

El seguimiento de la calidad de las aguas fluviales se realiza en gran medida mediante análisis físico-químicos. Este tipo de análisis aporta una visión puntual, una “fotografía” del estado de las aguas en un momento determinado. Pero en la actualidad hay miles de productos tóxicos listados y es difícil establecer una rutina de análisis periódicos que sean económicamente viables y además revelen con la fiabilidad necesaria no sólo el estado del agua tras un vertido puntual (para lo cual los análisis físico-químicos son imprescindibles) sino los daños de éstos a largo plazo[1,4].

Los invertebrados bentónicos son muy buenos bioindicadores de la calidad de las aguas. El modo de vida de estas especies les permite esconderse en los sedimentos. La diferencia en la concentración de un contaminante en los sedimentos y en las capas superiores del agua puede ser grande y el modo de vida del bioindicador debe tenerse en cuenta para reflejar su exposición real a los contaminantes estudiados. El organismo utilizado en este estudio es *Chironomus riparius*, ampliamente utilizado en tests de toxicología acuática y uno de los indicadores biológicos de calidad de aguas basados en protocolos aprobados por las agencias internacionales de protección ambiental (EPA, 1996; OCDE 2001) [2,3]. Entre las razones de su uso se encuentran las siguientes[5]:

- Su tamaño facilita el muestreo.
- Su amplia diversidad proporciona una gama casi infinita de tolerancias a diferentes parámetros de contaminación.
- Tras una perturbación necesitan un tiempo de recolonización igual o superior a un mes, lo que facilita la monitorización de los efectos del vertido a medio o largo plazo.

La calidad de agua a través de bioindicadores se establece mediante los denominados *índices bióticos*, entre los que se encuentran el BMWP inglés, el IQBG francés y las adaptaciones de ambos a los ríos españoles. [1,4-7]. Estos índices asocian a la presencia y cantidad de cada taxón bioindicador (por ejemplo el propio *Chironomus*) un valor, en base a las cantidades de referencia registradas en ausencia de tóxico. El cómputo general obtenido mediante varios de estos bioindicadores proporciona la calidad del agua según una clasificación establecida.

En España el uso de los macroinvertebrados bénticos como bioindicadores se encuentra regulado desde el año 2000 por la normativa europea ISO 8689-1:2000: *Calidad del agua. Clasificación biológica de los ríos. Parte 1: Guía para la interpretación de los datos relativos a la calidad biológica a partir de estudios de macroinvertebrados bénticos.*

En un principio, la Ecotoxicología analizó la toxicidad de los contaminantes viendo el efecto de estos sobre diferentes organismos, por medio de bioensayos realizado en el laboratorio. Así, a la hora de establecer los valores de referencia en el marco legal son de gran importancia los *test de ecotoxicidad*, experimentos dirigidos a estudiar si un compuesto potencialmente tóxico causa una respuesta relevante en los organismos testados y, en caso afirmativo, determinar la concentración que causa un efecto determinado, que pueda ser distinguido de la variabilidad de fondo: la supervivencia del 50% de la población, del 10%, etc. [5-8]. Los organismos en cuestión se exponen a diferentes concentraciones del compuesto, a la vez que se observa un grupo igual no expuesto, que se usa como control.

En este tipo de estudios son de gran utilidad los modelos matemáticos, que por un lado ayudan a diseñar las mejores condiciones del experimento aportando algunos datos *a priori*, y por otro permiten realizar estudios comparativos entre diferentes organismos o poblaciones del mismo organismo, así como entre los efectos de distintos tóxicos utilizando un número menor de animales. Así mismo los denominados *modelos biológicos (Biology-based methods)* ayudan a comprender la toxicocinética y toxicodinámica subyacentes, proporcionando información sobre el proceso de detoxificación del compuesto en el organismo elegido.

1.1. Análisis de supervivencia

Los *análisis de supervivencia* han sido intensamente estudiados en las últimas décadas a través de diferentes disciplinas. La supervivencia no tiene por qué ser necesariamente en sentido literal, como ocurre en nuestro caso y en general en Biología o Medicina, sino que puede referirse a cualquier hecho que ocurra una sola y definitiva vez, pudiendo ser desde el fallo de una pieza en ingeniería a cualquier acto irreversible e irreplicable en Sociología (primer trabajo, primer embarazo, jubilación, etc.) [9, 11, 12].

Pero en Ecotoxicología la experiencia estadística en Análisis de Supervivencia se encara con nuevos retos derivados tanto de la actual abundancia de tóxicos en el medioambiente, como de la necesidad de complementarse, desde un encuadre multidisciplinar, con los avances en Toxicodinámica o Genética entre otros.

Hasta hace poco el objetivo principal del análisis de supervivencia en toxicología consistía en el cálculo de la *concentración letal* o LC_x y el *tiempo letal* o LT_x , donde x se refiere al tanto por ciento de población viva. Así el LC_{50} es la concentración a la cual sobrevive la mitad de la población inicial en un intervalo temporal preestablecido y el LT_{50} es el tiempo tras el cual sobrevive la mitad de la población para una concentración dada. Sin embargo el uso de estos parámetros tiene algunas limitaciones [13]:

- El rango de días al que es aplicable el compuesto varía enormemente de una especie a otra, y entre un tóxico y otro, de manera que los LC_{50} son difícilmente comparables.
- Es una medida puntual que da escasa o nula información sobre el comportamiento de la población en su conjunto.

Los modelos de Estadística Paramétrica, así como los modernos *modelos biológicos (Biology-based methods)*, de reciente aparición y en constante desarrollo [8,14-16], intentan con la ayuda de las nuevas

tecnologías y con las limitaciones y variabilidad implícitas a tratar con organismos vivos, recabar más información de la fisiología del organismo a partir del análisis de supervivencia, consiguiendo a través de los parámetros obtenidos datos que puedan ser de mayor utilidad para los biólogos y de un mayor valor predictivo, como tasas de absorción y eliminación, mortalidad de base, etc.

Los estudios de supervivencia encaminados a la obtención de la concentración de 50% de supervivencia LC50, o cualquier otra LCx, observan con frecuencia la supervivencia con diferentes concentraciones en un tiempo prefijado. De esta forma se evita la variabilidad intrínseca al tiempo: edad, mecanismos de reparación, etc., pero por esa misma razón aporta menos información. Otras veces se estudia el efecto del tiempo de exposición con una concentración fija para hallar el LT50, es decir, el tiempo de supervivencia 50% a concentración dada.

Tanto en los modelos paramétricos como en los biológicos el análisis de supervivencia se basa en dos funciones matemáticas: la *función de supervivencia* y la *función riesgo*, términos habituales en este tipo de estudios.

Sea T una variable no negativa que representa el instante en el que ha ocurrido el evento de interés, en nuestro caso, la muerte del animal. Asumamos que es una variable continua de *función densidad de probabilidad* f(t) y *función de distribución* F(t).

Podremos trabajar con el suceso complementario, la *supervivencia*, que queda definida como:

$$S(t) = P(T > t) = 1 - F(t) = \int_t^{\infty} f(x)dx \quad (1)$$

La función de supervivencia por tanto proporciona la probabilidad de estar vivo en el instante t o, más genéricamente, la probabilidad de que el evento de interés no haya ocurrido en t.

Otro concepto importante en Análisis de Supervivencia es la *función riesgo (hazard)*, definida como la probabilidad instantánea de abandonar el estado de "vivo" en t, condicionado a haber sobrevivido hasta el tiempo t. Es una tasa de mortalidad instantánea. [9,10]

$$h(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{P(t \leq T < t + \Delta t | T \geq t)}{\Delta t} = \frac{f(t)}{1 - F(t)} = \frac{f(t)}{S(t)} \quad (2)$$

Relación entre ambas funciones:

$$h(t) = -\frac{d \ln S(t)}{dt} \quad (3)$$

$$S(t) = \exp\left(-\int_0^t h(u)du\right) \quad (4)$$

1.2. Chironomus riparius

El *Chironomus riparius* es un insecto díptero¹, un mosquitomuy común en el Hemisferio Norte ampliamente utilizado en estudios de ecotoxicidad acuática. Por un lado son invertebrados clave en la cadena trófica de

¹Los insectos dípteros se caracterizan por poseer un solo par de alas membranosas en vez de dos como otros insectos. A este grupo pertenecen, entre otros, las moscas, mosquitos y tábanos.

los ecosistemas acuáticos no marinos. Por otro sus larvas habitan en los sedimentos acuáticos, que constituyen una zona de acumulación de productos tóxicos.

Su ciclo vital comprende cuatro fases [17], todas ellas acuáticas salvo la de adulto:

1. Huevo: las hembras depositan masas de huevos en la superficie del agua, cada una de las cuales puede contener más de 600 huevos que eclosionan en pocos días.
2. Larva: la fase larvaria comprende 4 estadios, los tres últimos son los que el animal silvestre pasa en sedimento. El cuarto estadio es el elegido habitualmente para ensayos de ecotoxicidad, su duración es aproximadamente de una semana.
3. Pupa: es el estadio intermedio entre larva y adulto, y dura apenas unas horas.
4. Adulto: es el único estadio aéreo de los cuatro.

La duración del ciclo completo depende de variables como la temperatura y la disponibilidad de alimentos, siendo en condiciones de laboratorio de unas tres semanas.

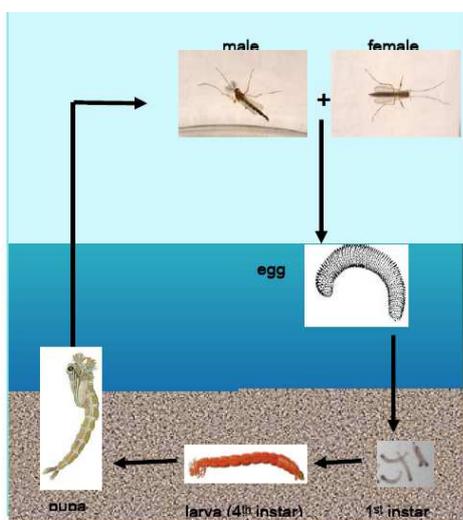


Fig. 1: ciclo de vida del *Chironomus riparius* en su hábitat natural [17].

Chironomus riparius es ampliamente utilizado en bioensayos de toxicidad en ecosistemas acuáticos y como indicador biológico de la calidad de aguas, y está seleccionado como invertebrado béntico de referencia para investigar los efectos de los contaminantes acuáticos asociados a sedimentos. Es sensible a los contaminantes y las larvas son un elemento fundamental en las cadenas tróficas, ya que suelen ser presa de otros insectos, peces y aves acuáticas. Es además una especie de fácil cultivo en laboratorio en las condiciones adecuadas y las diferentes fases de su desarrollo son fácilmente identificables.

1.3. Bisfenol A (BPA)

1.3.1. Estructura

Bisfenol A ó 4,4' dihidroxi 2,2 difenil propano (IUPAC)

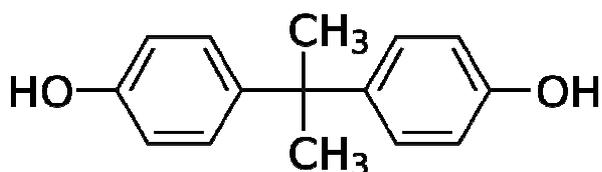


Fig. 2: Estructura química del BPA.

Está compuesto por consiguiente por dos anillos fenil con sendos grupos hidroxilo, unidos a una cadena de tres átomos de carbono. Se obtiene combinando acetona y fenol.

1.3.2. Presencia en el entorno

El BPA es utilizado principalmente como material para la producción de resinas epoxi y plásticos policarbonatados. La producción mundial de BPA en 2006 se estimó en 4 millones de toneladas [16].

Las resinas epoxi están presentes en las superficies lacadas de las latas y la parte de las tapas de los botes de cristal en contacto con los alimentos, adhesivos, partes de automóvil, aplicaciones aeroespaciales, cubiertas de tubos de PVC y acabados diversos.

El policarbonato es un polímero del BPA caracterizado por su ligereza y resistencia, por lo que se utiliza en gran variedad de productos: CDs, DVDs, botellas de plástico, envolturas de alimentos, equipamientos del automóvil, sellos dentales y lentes de contacto.

El BPA se utiliza también en el papel de impresión térmica utilizado en los tickets de supermercado, parkings, etc.

En cuanto a la presencia medioambiental, puede encontrarse BPA en agua, aire y suelos:

- El BPA del medio acuático procede en su mayoría de las aguas residuales mal gestionadas por las industrias productoras de BPA, así como de vertederos y lixiviación de aguas residuales [18,19]. El BPA de los ríos puede ser degradado por bacterias en condiciones aerobias. Sin embargo, la vida media del BPA antes de la degradación es de unos 3-5 días, suficiente para afectar a los organismos acuáticos. En el agua marina el BPA persiste mucho más, unos 30 días, por las diferentes condiciones físico-químicas así como las distintas bacterias de cada medio, por lo que la posibilidad de contaminación de organismos superiores puede ser mayor [18,20]
- El BPA es absorbido también por el suelo. En concreto en los sedimentos de los ríos contaminados los niveles de BPA son mayores que en el agua superficial, afectando de ese modo a gran cantidad de organismos que, como el *Chironomus riparius*, pasan en este medio gran parte de su ciclo vital.
- La concentración de BPA en el aire es baja, y se foto-degrada en menos de 8 horas de media [18], de modo que la probabilidad de inhalar BPA es mínima. La excepción la constituyen los trabajadores de empresas productoras de BPA y derivados.

En diversos estudios en medio acuático en Europa, Japón y EEUU se han detectado concentraciones de BPA de entre 8 µg/L a 21 µg/L y en sedimentos de 0.5 a 1630 µg/kg [21-23]. En España se realizó un estudio en el río Llobregat y afluentes, encontrándose concentraciones de BPA muy superiores, entre 0.09 y 2.7 mg/l.

1.3.3. Efectos

Ya en los años 30 del siglo pasado se caracterizó al BPA como “estrógeno ambiental” cuando se mostró que estimulaba el aparato reproductor de ratas hembra [24] y los estudios aumentaron tras su utilización generalizada en la síntesis de policarbonatos y resinas epoxi a partir de los años 50.

Sin embargo, los últimos años ha aumentado la preocupación por su utilización en productos en contacto con alimentos (botellas, latas, envases, biberones, etc.) , ya que las investigaciones recientes demuestran otras rutas de actuación por *disrupción endocrina*² además de la unión a los receptores de estrógeno: alteraciones en la síntesis de hormonas endógenas, metabolismo hormonal y concentraciones hormonales

²Un disruptor endocrino es una sustancia que interfiere con el sistema endocrino, es decir, que posee la capacidad de modular o interrumpir la síntesis, secreción, transporte, enlace o eliminación de hormonas endógenas afectando a la homeostasis, desarrollo, reproducción y comportamiento normal del organismo [25].

en sangre, cambios en los receptores hormonales, e interacción con otros sistemas hormonales, como el sistema tiroideo [18,19,21].

En noviembre de 2006 se reunió en Chapel Hill (Carolina del Norte, EEUU) un panel de expertos procedentes de universidades de los cinco continentes que redactó un consenso conocido como *Chapel Hill Bisphenol A Expert Panel Consensus Statement* [25]. En este documento se señaló la preocupación suscitada por el hallazgo extendido de BPA en tejido humano y animal, así como por la sospecha de sus efectos nocivos a dosis muy por debajo de los límites permitidos.

Así mismo, y puesto que los últimos años ya han aumentado las investigaciones en humanos y animales vertebrados, el Panel de Expertos de Chapel Hill aconsejó un mayor estudio de los efectos del BPA en invertebrados, especialmente los acuáticos, dada su importancia en estos ecosistemas y la escasez de investigación con ellos.

En el presente trabajo se estudiará la supervivencia en condiciones de laboratorio del mosquito *Chironomus riparius* expuesto a BPA. Se realizará un estudio comparativo de dos modelos paramétricos frente al modelo biológico de la teoría DEB, analizando las ventajas así como las carencias de cada uno de ellos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cultivo de larvas

Los experimentos se realizaron con larvas de cuarto estadio de *C. riparius* que fueron obtenidas de cultivos de laboratorio, a partir de una generación inicial recolectada en su hábitat natural en Valencia y cultivadas en las condiciones habituales de laboratorio según los protocolos aprobados por las agencias internacionales de protección ambiental (EPA, 1996; OCDE 2001). Las larvas fueron cultivadas desde la masa de huevos en un medio de cultivo (0.5mM CaCl₂, 1mM NaCl, 1mM MgSO₄, 0.1mM NaHCO₃, 0.025 mM KH₂PO₄, 0.01 mM FeCl₃) suplementado con hojas de ortiga, comida para peces comercial y papel de celulosa en tanques de polietileno de 500ml. Los cultivos fueron mantenidos en condiciones de aireación a 18° C y bajo periodos de luz-oscuridad (16L:8O).

2.2. Bioensayo de supervivencia

Las concentraciones de BPA estudiadas fueron 3-4-5-6-7 mg/l y la selección de la dosis se apoyó en estudios previos con *Chironomus* y otros artrópodos.

Cada una de ellas se analizó en dos experimentos independientes y en cada uno de éstos se utilizaron tres réplicas de 50 larvas.

En los bioensayos de supervivencia las larvas fueron expuestas al compuesto diluido en medio de cultivo hasta 96 horas en recipientes de 200ml y se respetaron las condiciones habituales de laboratorio: ciclos de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz, y temperatura de 18° C. También se utilizó el mismo medio de cultivo (0.5mM CaCl₂, 1mM NaCl, 1mM MgSO₄, 0.1mM NaHCO₃, 0.025 mM KH₂PO₄, 0.01 mM FeCl₃).

Las réplicas consistieron en 50ml de medio de cultivo y 24µl de disolución de BPA en etanol, preparada según cada caso a partir de un stock común de 25 g/l. En los controles se utilizó 24 µl de etanol. Para evitar la foto-degradación del bisfenol cada recipiente fue cubierto con papel aluminio por la zona inferior y lateral, y situados en bandejas tapadas igualmente con papel aluminio, dejando orificios para la aireación.

A las 48 horas se renovó completamente el medio de cultivo y el BPA, y se les proporcionó 3mg de comida por réplica.

2.3. Métodos estadísticos de análisis de supervivencia

El análisis de supervivencia efectuado en este estudio se caracteriza por lo siguiente:

- Se estudia el evento supervivencia: el *número de supervivientes* observados a intervalos temporales predefinidos, de modo que los datos son discretos y están agrupados. Lo que se intenta modelar por tanto es la *supervivencia en función del tiempo*.
- Se repite el estudio con varias concentraciones, intentando fijar el mismo modelo a todas ellas.
- Los datos de las concentraciones menores presentan censura por la derecha, esto es: cuando se termina la observación aún quedan larvas vivas, de modo que no se conocen exactamente sus datos de supervivencia, salvo que es mayor que ese último tiempo observado.

Entre los diversos métodos de análisis de supervivencia en el presente estudio se han utilizado los siguientes, escogidos por proporcionar un buen muestrario de las diferentes técnicas disponibles hoy en día:

1. *Modelos paramétricos*: se ajustan los datos a modelos conocidos en Toxicología, calculando los parámetros de dichos modelos, pero sin considerar estos parámetros ligados a un modelo biológico, es decir, se ajustan los datos a curvas sin intentar buscar causas de tipo biológico que lo justifiquen. Se ha aplicado el método de Gehan y Siddiqui [13,26] que analiza y compara el ajuste a cuatro distribuciones: exponencial, Weibull, Gompertz y exponencial lineal.
2. Como modelo paramétrico alternativo se ha empleado el ajuste por mínimos cuadrados (regresión no lineal) a una distribución que proporcionaba un buen ajuste visual.
3. *Modelos biológicos*: de aparición reciente, intentan encontrar un modelo biológico subyacente que justifique a la vez la supervivencia a todas las concentraciones utilizadas y proporcione más información sobre el animal y la absorción-eliminación del tóxico. Aún son escasos y el único modelo existente de aplicación general es el Dynamic Energy Budget Model, o DEB model y su soporte informático DEBtox.

El modelo biológico ofrece más información sobre el proceso toxicocinético que los modelos puramente estadísticos, aportando datos sobre las tasas de absorción y eliminación del compuesto, así como cualquiera de las LCx, LTx que pudieran necesitarse para el diseño futuro de nuevos experimentos. Pero el resultado puede variar en función del número de concentraciones introducidas, y en el caso de un parámetro tan relevante como la concentración de no efecto o NOEC la variabilidad es grande.

2.3.1 Modelos paramétricos. Método de regresión de Gehan y Siddiqui

El método de regresión de Gehan y Siddiqui [11,23] ajusta los datos de supervivencia a cuatro de las distribuciones más utilizadas en Toxicología: Exponencial, Weibull, Gompertz y Exponencial Lineal.

Gehan y Siddiqui asumen que la función riesgo en cada intervalo de tiempo es constante y que el número de individuos que mueren en cada uno es una variable aleatoria multinomial, de modo que:

- La probabilidad de morir en el intervalo i -ésimo por parte de un individuo que ha sobrevivido hasta ese momento es $e^{-h_i \cdot b_i}$ siendo b_i la anchura del intervalo temporal y h_i la función riesgo en dicho intervalo.
- La probabilidad de sobrevivir, análogamente es $1 - e^{-h_i \cdot b_i}$

La función de log- verosimilitud es por tanto:

$$\ln L = - \sum_{i=1}^{s-1} h_i b_i r_i + \sum_{i=1}^{s-1} (n_i - r_i) \ln (1 - e^{-h_i b_i}) \quad (5)$$

Siendo r_i el número de supervivientes en el intervalo i -ésimo y s el número de intervalos temporales medidos.

Derivando esta expresión se obtiene una estimación verosímil del riesgo en cada intervalo temporal, dada por:

$$\hat{h}_i = -\frac{\ln\left(\frac{r_i}{n_i}\right)}{b_i} \quad (6)$$

Por otro lado, las cuatro distribuciones utilizadas en este método se caracterizan porque o bien la función riesgo o bien su logaritmo se puede expresar como una función lineal de t o de su logaritmo $\ln(t)$:

DISTRIBUCIÓN	SUPERVIVENCIA	RIESGO
Exponencial	$S(t) = \exp(-\lambda t)$	$h(t) = \lambda$
Weibull	$S(t) = \exp(-(\lambda t)^\gamma)$	$h(t) = \lambda \gamma t^{\gamma-1}$ $\ln h(t) = \ln(\lambda \gamma) + (\gamma - 1) \ln t$
Gompertz	$S(t) = \exp\left(-\left(\frac{\gamma}{\lambda}\right)(\exp(\lambda t) - 1)\right)$	$h(t) = \gamma \cdot \exp(\lambda t)$ $\ln(h(t)) = \ln(\gamma) + \lambda t$
Exponencial lineal	$S(t) = \exp\left(-\lambda t - \frac{1}{2}\gamma t^2\right)$	$h(t) = \lambda + \gamma t$

Tabla 1: distribuciones utilizadas por el método de Gehan y Siddiqui

Por lo tanto la función riesgo(o su logaritmo) en los cuatro casos va a poder escribirse en la forma $y=a+bx$, y estimar los parámetros a y b mediante el método de mínimos cuadrados, introduciendo los datos de supervivencia a través de la expresión del riesgo estimado \hat{h}_i .

Una vez hallados los parámetros correspondientes a cada una de las cuatro distribuciones, para elegir entre ellas se utiliza de nuevo la función de log-verosimilitud, optando por el modelo que proporcione el valor más alto de dicha función.

Así mismo, puesto que la exponencial puede considerarse un caso de las otras distribuciones, preferente por depender sólo de un parámetro, Gehan y Siddiqui propusieron comparar el modelo elegido con la exponencial, ya que ésta depende sólo de un parámetro y le corresponde un riesgo constante, y determinar si hay diferencias significativas entre ambos. Para ello se utiliza el siguiente estadístico que se distribuye bajo la hipótesis nula (no hay diferencias significativas entre ambas) como una chi cuadrado con un grado de libertad:

$$2 \cdot [\ln L(a) - \ln L(b)] \quad (7)$$

siendo $\ln L(a)$ la función de log verosimilitud con los valores predichos por el modelo escogido en principio, y $\ln L(b)$ el valor de dicha función con la distribución exponencial. Este test permite decidir entre la distribución que haya obtenido mayor función log verosimilitud entre las tres calculadas (Weibull, Gompertz o exponencial lineal) y una distribución exponencial simple, que será preferible si según el test no hay diferencias significativas.

Una vez elegido el modelo definitivo el test de bondad de ajuste se realiza calculando

$$2 \cdot [\ln L(A) - \ln L(B)] \quad (8)$$

Siendo ahora $\ln L(A)$ la función de verosimilitud del modelo final y $\ln L(B)$ la de los datos. Este estadístico se distribuye bajo la hipótesis nula (no hay diferencias significativas entre ambos modelos) como una chi

cuadrado con (s-1-k) grados de libertad, siendo s el número de intervalos temporales y k el número de parámetros del modelo escogido.

En el presente trabajo se ha optado por una modificación de este método: para comparar con los otros modelos se ha elegido la distribución que proporcionaba el mejor ajuste (mínimo valor de la expresión (7)) aunque el estadístico representado en la ecuación (8) permitiera simplificar a una función exponencial.

2.3.2 Modelos biológicos: DEBtox

2.3.2.1 Teoría DEB (Dynamic Energy Budget)

El propósito de estos modelos no es solamente describir los efectos observados, sino comprender los fenómenos toxicocinéticos relacionados con la supervivencia y mortalidad, tales como absorción, distribución, localización o fijación y eliminación.

El más conocido de estos modelos, y el único recogido por la Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) en su *Guía de Aplicación de Datos de Ecotoxicidad [8]* es el basado en la teoría **DEB**, desarrollado a partir del año 2000 por Kooijman y su equipo de Biología Teórica de la Universidad de Amsterdam [14-16].

Es un modelo general que contempla no sólo análisis de supervivencia, sino también de alimentación, crecimiento y reproducción. La parte que nos atañe, la de supervivencia, realiza dos suposiciones principales:

- el riesgo $h(t)$ es proporcional a la concentración del compuesto en el animal.
- la cinética del compuesto se plantea mediante un modelo lineal monocompartimental.³

2.3.2.2. Modelo de supervivencia

El modelo cinético monocompartimental sugerido es el siguiente:

$$\frac{d[Q](t)}{dt} = k_u c(t) - k_a [Q](t) \quad (9)$$

Donde (Ver tabla 2):

$[Q](t)$ es la concentración de tóxico en el interior del animal.

$c(t)$ es la concentración de tóxico en el medio.

k_u es la tasa de absorción (*uptake rate*).

k_a es la tasa de eliminación (*elimination rate*)

³ El modelo uni- o monocompartimental considera el organismo como una sola unidad homogénea o compartimento, que representa habitualmente plasma, sangre y sueros, a los que el tóxico accede de forma inmediata. Esto no significa necesariamente que en cualquier instante exista la misma concentración en todos los tejidos, sino que cualquier cambio que ocurra en el plasma o fluidos representados refleja cuantitativamente los cambios ocurridos en los niveles tisulares. [29]

Si consideramos que la concentración en el medio es constante en el tiempo para cada experimento, $c(t)=c$, y que inicialmente los animales (en nuestro caso las larvas de Chironomus) estaban sanos y por tanto no había tóxico en su interior $[Q](0)=0$ la integración de (1) nos lleva a :

$$[Q](t) = \frac{k_u}{k_a} c(1 - e^{-k_a t}) \quad (10)$$

Recordemos ahora la otra suposición principal: la tasa de riesgo $h(t, c)$ es proporcional a la concentración de tóxico en el animal, en concreto, a la diferencia entre esta concentración y la *concentración de no efecto (NEC)*, $[Q]_0$ en el animal y c_0 en el medio. Por tanto:

$$h(t, c) \propto [Q](t) - [Q]_0 = \frac{k_u}{k_a} (c(1 - e^{-k_a t}) - c_0) \quad (11)$$

Si se ordena y se reúnen las constantes de proporcionalidad en la *tasa de muerte* $k_+ \propto \frac{k_u}{k_a}$ tenemos:

$$h(t, c) = \begin{cases} k_+ (c(1 - e^{-k_a t}) - c_0) & \text{si } c > c_0 \\ \lambda & \text{si } c < c_0 \end{cases} \quad (12)$$

Donde se ha introducido el *riesgo basal*, λ , que corresponde al riesgo en ausencia de tóxico o cuando su concentración es menor a la de no efecto o NEC.

La función de supervivencia se calcula a partir de la función de riesgo:

$$S(t, c) = \begin{cases} \exp\left(\frac{k_+}{k_a} c(e^{-k_a t_0} - e^{-k_a t}) - k_+ (c - c_0)(t - t_0)\right) & \text{si } c > c_0, t > t_0 \\ \exp(-\lambda t) & \text{en el resto} \end{cases} \quad (13)$$

En esta expresión se ha introducido t_0 , que es el tiempo necesario para que en el interior del organismo la concentración del tóxico alcance el valor de no efecto $[Q]_0$ y que se expresa como:

$$t_0 = -1/k_a \cdot \ln(1 - c_0/c) \quad (14)$$

El objetivo es por tanto obtener esta función de supervivencia $S(t, c)$ mediante la estimación de $\theta = (c_0, k_+, k_a, \lambda)$, parámetros que a su vez nos proporcionarán información adicional sobre el sistema (Ver tabla 2).

Símbolo	Dimensión	Interpretación
t	T	Tiempo
t ₀	T	Tiempo en el que [Q] excede el nivel de no efecto
h	T ⁻¹	Riesgo
c	ML ⁻³	Concentración del compuesto en el medio
c ₀	ML ⁻³	Concentración de no efecto en el medio (NOEC)
[Q]	ML ⁻³	Concentración del compuesto en el animal
[Q] ₀	ML ⁻³	Concentración de no efecto en el animal
k _u	T ⁻¹	Tasa de absorción
k _a	T ⁻¹	Tasa de eliminación
k ₊	L ³ M ⁻¹ T ⁻¹	Tasa de muerte
λ	T ⁻¹	Tasa de mortalidad del control
q(t,c)	-	Probabilidad de supervivencia en el instante t a la concentración c
p _{ij}	-	Probabilidad de morir entre t _{i-1} y t _i a concentración c _j
n _{ij}	-	Número de animales muertos entre t _{i-1} y t _i a concentración c _j
x _{ij}	-	Número de animales supervivientes en el instante t _i y concentración c _j

Tabla2: lista de símbolos utilizados en el análisis de supervivencia de la Teoría DEB.

2.3.2.3. Estimación de parámetros

En experimentos de evaluación de letalidad del tóxico los datos consisten en conteos de individuos supervivientes x_{ij} en intervalos de tiempo t_i , siendo $i=0, \dots, r$ y concentraciones c_j , donde $j=1, \dots, k$.

Para la estimación de los parámetros del modelo se utiliza el método de máxima verosimilitud. Para construir la función de máxima verosimilitud se parte de una distribución multinomial de probabilidad de la forma siguiente:

La probabilidad de que un organismo expuesto a la concentración c_j muera entre los instantes t_{i-1} y t_i está dada por:

$$p_{ij} = q(t_{i-1}, c_j) - q(t_i, c_j) \quad (15)$$

El número de organismos muertos en ese periodo:

$$n_{ij} = x_{i-1,j} - x_{ij} \quad (16)$$

La probabilidad de obtener un conteo de x_{ij} puede escribirse ahora como un producto de probabilidad multinomial:

$$Prob(x_{ij}) = Prob(n_{ij}) = \prod_{j=1}^k x_{0j}! \prod_{i=1}^{r+1} \frac{p_{ij}^{n_{ij}}}{n_{ij}!} \quad (17)$$

Tras introducir logaritmos e ignorar los términos constantes la función de log verosimilitud viene dada por:

$$l(\theta, x_{ij}) = \sum_{i=1}^{r+1} \sum_{j=1}^k n_{ij} \ln(p_{ij}) \quad (18)$$

Donde θ representa el vector de los parámetros que se desean calcular (ver tabla 2): $\theta (c_0, k_+, k_-, \lambda)$

Las estimaciones de los parámetros por el método de máxima verosimilitud se encuentran resolviendo las ecuaciones:

$$\frac{\partial l}{\partial \theta} = 0 \rightarrow \sum_{i=1}^{r+1} \sum_{j=1}^k \frac{n_{ij}}{p_{ij}} \frac{\partial p_{ij}}{\partial \theta} = 0 \quad (19)$$

2.3.3. Soporte informático

El ajuste a modelos paramétricos se realizó con la ayuda de MATLAB versión R2010b. En concreto se utilizó fminsearch de Optintool para la optimización de funciones y cftool (Curve Fitting Tool) para el ajuste de curvas por mínimos cuadrados.

El modelo DEB se analizó a través de su propio software de libre distribución DEBtox versión 2.1, 2004. Este software realiza todos los cálculos a partir de los datos de concentración y supervivencia, y además de los parámetros señalados (tasas de muerte y eliminación, riesgo basal y concentración de no efecto) proporciona también estimaciones de LC50, LT50 y en general cualquier LCx, LTx.

3. RESULTADOS

3.1 Modelos paramétricos. Método de Gehan y Siddiqui modificado

Los resultados de la aplicación del método de Gehan y Siddiqui a los datos de supervivencia a cada concentración de BPA se recogen en la siguiente tabla:

Concentración	Distribución	Parámetros	2·[lnL(A)-lnL(B)]	LT50 (horas)
Control	Exponencial	$\lambda=0.00273 \pm 10^{-5} \text{ h}^{-1}$	—	254.2
3 mg/l	Gompertz	$\lambda= 0.02390 \pm 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ $\gamma = 0.00113 \pm 10^{-5} \text{ h}^{-1}$	0.277	114.8
4mg/l	Weibull	$\lambda= 0.00903 \pm 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ $\gamma= 1.89874 \pm 10^{-5}$	0.168	91.3
5mg/l	Exp. lineal	$\lambda= 0.00282 \pm 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ $\gamma= 0.00036 \pm 10^{-5} \text{ h}^{-2}$	0.226	54.9
6 mg/l	Weibull	$\lambda= 0.00133 \pm 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ $\gamma=1.74754 \pm 10^{-5}$	0.261	36.8
7mg/l	Exp. lineal	$\lambda= 0.00011 \pm 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ $\gamma= 0.00220 \pm 10^{-5} \text{ h}^{-2}$	0.189	25.0

Tabla 3: resultados del ajuste por el método de Gehan y Siddiqui

El método de Gehan y Siddiqui aconseja comparar estas funciones con una distribución tipo exponencial simple y analizar si existen diferencias significativas a través del estadístico comentado en el apartado 3.3. En todos los casos el resultado fue que no había diferencias estadísticamente significativas al nivel 5% para descartar la hipótesis nula (la exponencial, es decir, riesgo constante), ya que en todos ellos el valor del estadístico $2 \cdot [\ln L(A) - \ln L(B)]$ fue inferior a $\chi^2_{1,0.05} = 3.841$. Es decir, siguiendo el método de Gehan y Siddiqui se habría elegido la función exponencial para todas las concentraciones. Sin embargo, puesto que en este trabajo se pretende comparar los resultados con los obtenidos por otros métodos se ha elegido en cada caso la función que proporcionaba el mejor ajuste, independientemente de que precise uno o dos parámetros.

Por esta variación del método de Gehan y Siddiqui al control le corresponde una exponencial simple, a 3 mg/l le corresponde una distribución de Gompertz, a 4 mg/l y 6 mg/l una Weibull, mientras que las concentraciones de 5 mg/l y 7 mg/l alcanzan el mayor valor de la función de verosimilitud con una distribución tipo exponencial lineal. No se observa una pauta que pueda relacionar la concentración con el tipo de distribución. Puede consultarse la tabla 3 para ver la función de supervivencia en cada caso.

A partir de la curva escogida para cada concentración se ha calculado igualmente la LT50, esto es, el intervalo temporal tras el cual sobrevive sólo la mitad de la población inicial, recogido en la tabla 3.

En la representación conjunta de la Fig. 4 se aprecia que la curva de supervivencia del control con etanol se cruza con la de 3mg/l a las 64.5 horas. Si bien hasta entonces la supervivencia es similar para ambos casos a partir de ese momento el control continúa con una caída suave, mientras que aumenta la tasa de descenso de la supervivencia a 3mg/l.

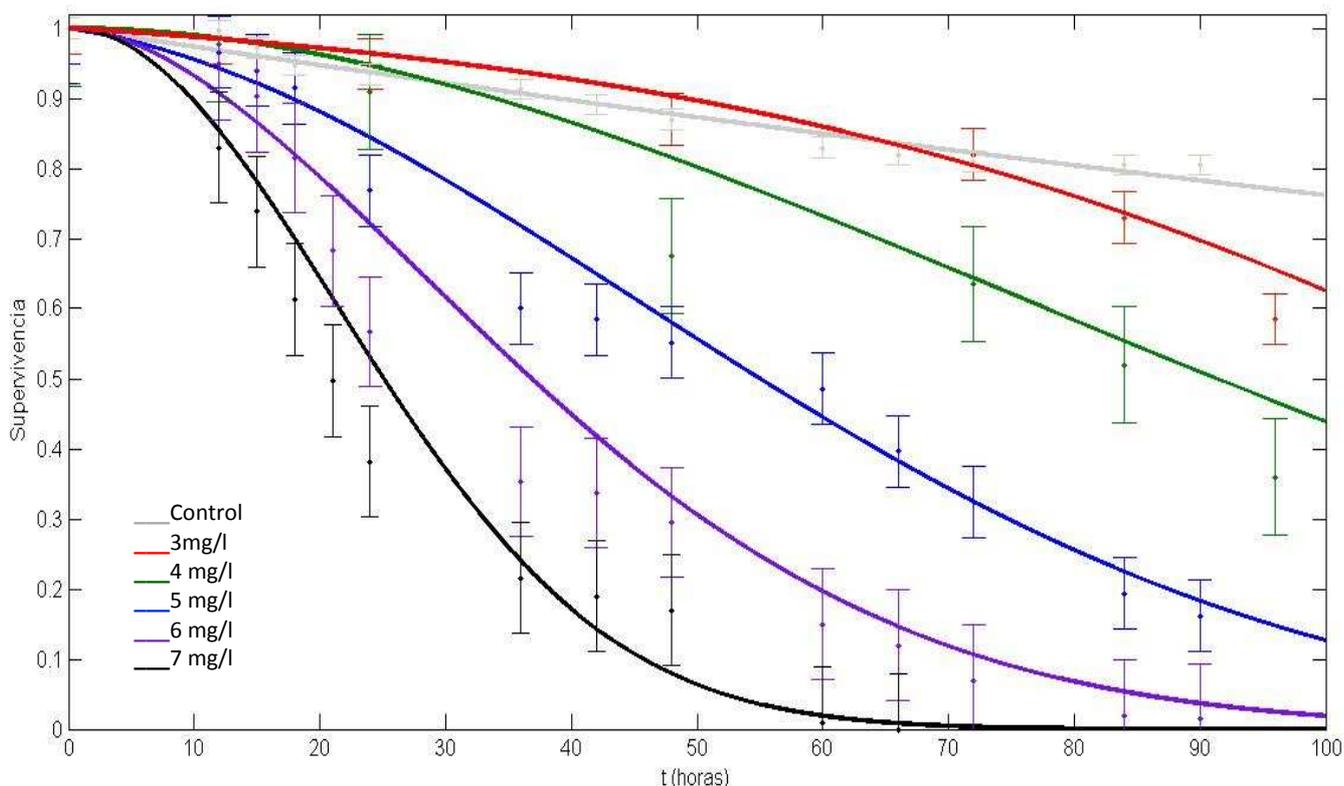


Fig. 3: Representación conjunta de las curvas de supervivencia obtenidas por el método de Gehan y Siddiqui modificado.

Las barras de error representan la *desviación del ajuste* según la expresión dada por el *Root Mean Squared Error (RMSE)*:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-m}} \quad (20)$$

Donde y_i, \hat{y}_i son los datos observados y estimados respectivamente, n el número de datos y m el número de parámetros de la expresión, en nuestro caso m=5. Esta magnitud será utilizada también en el análisis de la bondad de ajuste del apartado 5.4.

3.2 Modelos biológicos. DEBtox

El conjunto de datos de supervivencia en todas las concentraciones más el control se introdujo en el software DEBtox, que proporcionó los siguientes resultados:

Tasa de eliminación: $k_o=0.1453 \text{ h}^{-1}$

Tasa de muerte: $k_+ = 0.0157 \text{ mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Riesgo basal: $\lambda = 0.0032 \text{ h}^{-1}$

Concentración de no efecto o NOEC: $c_0 = 3.57 \text{ mg/l}$

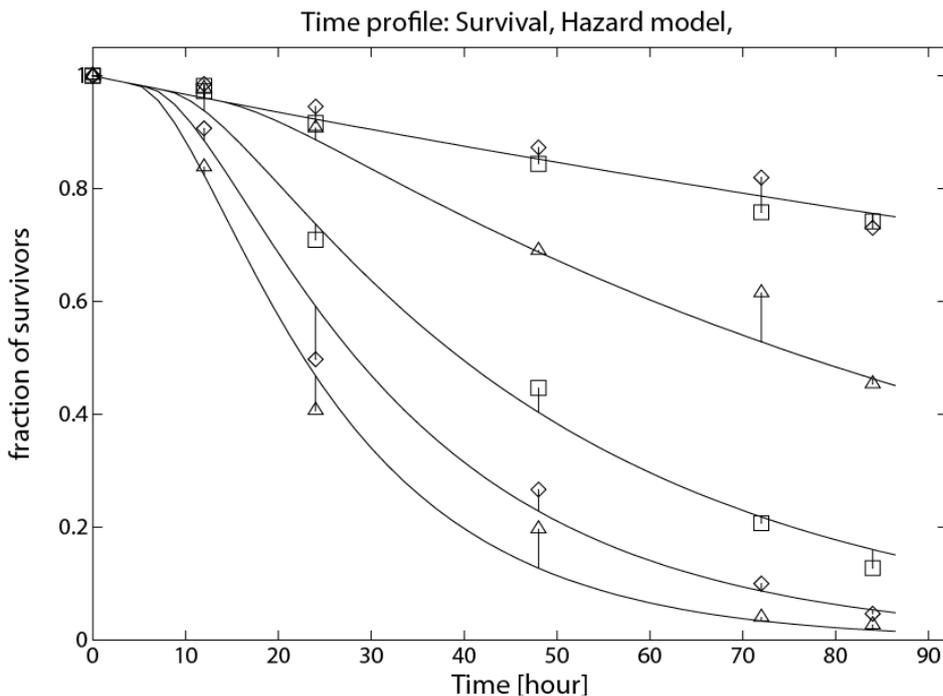


Fig.4: curvas de supervivencia del modelo biológico DEBtox., tal como las presenta el programa. De arriba a abajo: 3mg/l, 4mg/l, 5mg/l, 6mg/l y 7mg/l

Así mismo para cada concentración se calculó el tiempo necesario para la supervivencia del 50% de la población o LT50, obteniéndose:

Concentración:	3 mg/l	4mg/l	5 mg/l	6 mg/l	7mg/l
LT50 (horas):	----	139	47.1	31.2	24.1

Tabla 4: resultados del LT50 proporcionados por el software DEBtox.

3.3. Ajuste a una distribución suma de dos Weibull

El método de Gehan y Siddiqui y el modelo de la teoría DEB difieren no solo en sus planteamientos, sino también en los resultados obtenidos, siendo una muestra de ello las diferencias en los valores de LT50 obtenidos por cada uno, sobre todo a concentraciones de 3-4-5-6 mg/l.

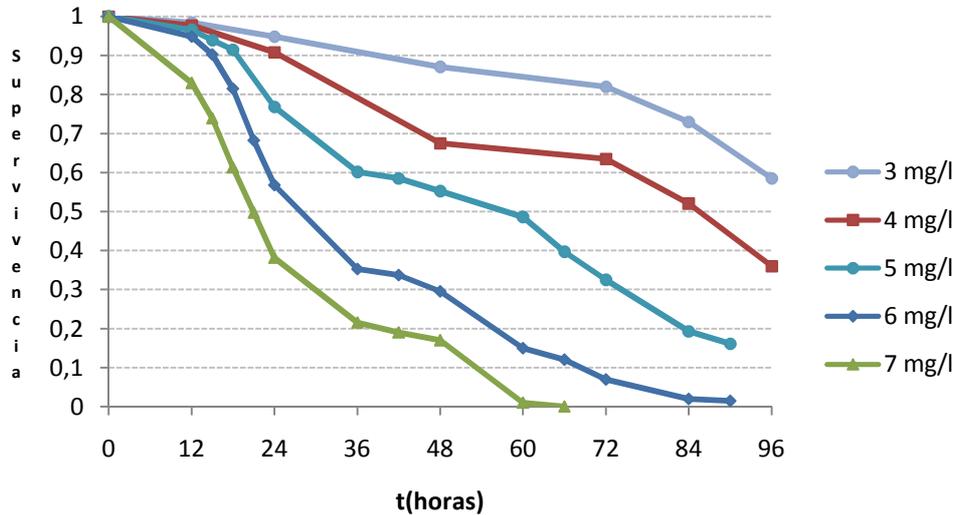


Fig.5: aspecto de los datos de supervivencia sin ningún modelo asociado.

Además ninguno de los dos se ajusta a la forma que adoptan los datos: una curva de supervivencia con caída en dos etapas, una primera muy pronunciada y una segunda caída más lenta, cuya forma se acentúa con la concentración, como se aprecia en la Fig. 6.

Por este motivo se probó un ajuste por mínimos cuadrados a otra distribución conocida en Análisis de Supervivencia: la combinación de dos distribuciones de Weibull [9].

Combinación de dos distribuciones de Weibull	
SUPERVIVENCIA	RIESGO
$S(t) = S_1(t) + S_2(t) =$ $= a_1 \exp(-(\lambda_1 t)^{\gamma_1}) + (1 - a_1) \exp(-(\lambda_1 t)^{\gamma_1})$	$h(t) = \frac{S_1(t) \cdot h_1(t) + S_2(t) \cdot h_2(t)}{S(t)}$

Tabla 5: supervivencia y función de riesgo de una suma de dos distribuciones tipo Weibull.

Para ello se empleó la utilidad cftool de Matlab, que realiza un ajuste de mínimos cuadrados no lineal. El resultado se muestra en la Fig. 6:

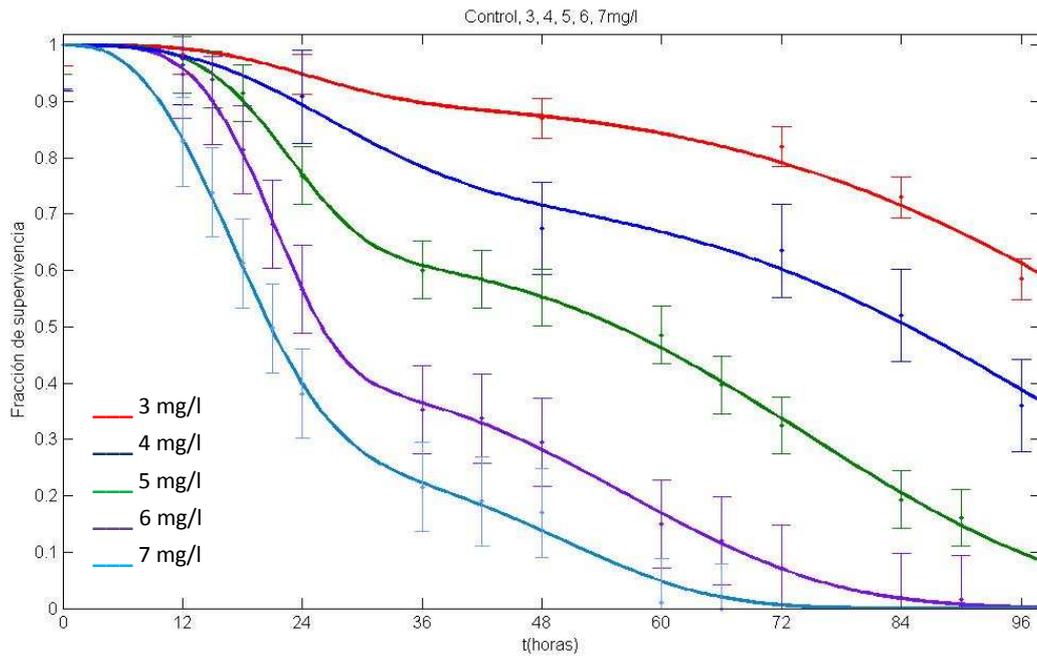


Fig. 6: ajuste de los datos a una suma de dos distribuciones tipo Weibull

También se calcularon valores para la LT50 de cada concentración:

Concentración:	3 mg/l	4mg/l	5 mg/l	6 mg/l	7mg/l
LT50 (horas):	107.1	84.3	55.5	25.9	20.7

Tabla 6: resultados de LT50 utilizando una distribución suma de dos Weibull

4.DISCUSIÓN

4.1. Comparación de los ajustes

El tiempo tras el que sobrevive sólo la mitad de la población a una concentración dada, o LT50, es un parámetro relevante en Toxicología. El resultado hallado por los tres métodos se resume en la tabla siguiente:

LT50(horas)					
Concentración:	3 mg/l	4mg/l	5 mg/l	6 mg/l	7mg/l
Método:					
Gehan Siddiqui	114.8	91.3	54.9	36.8	25.0
Doble Weibull	107.1	84.3	55.5	25.9	20.7
DEBtox	-----	133	46.5	31	24.1

Tabla.7: comparación del LT50 obtenido por los tres métodos

Esta tabla nos revela la falta de coincidencia de las estimaciones: los modelos de Gehan-Siddiqui y la distribución suma de Weibull presentan resultados similares entre ellas y muy dispares con los del software DEBtox para 3 y 4 mg/l (DEBtox ni siquiera proporciona el dato para 3mg/l). Según aumenta la concentración se reducen las diferencias entre los tres modelos, aunque los resultados distan de ser similares.

La LC50 o concentración a tiempo dado a los que sobrevive la mitad de la población debería calcularse por interpolación o extrapolación de las curvas a las concentraciones disponibles, por lo que sería aún menos fiable que el LT50.

Por otro lado la diferencia en los métodos de cálculo de cada modelo llevó a comparar la bondad de ajuste a través de los parámetros utilizados por MATLAB a tal efecto, y que son aplicables a los tres métodos:

- SSE (Summed Square of Residuals): mide la desviación de los datos a los valores estimados:

$$SSE = \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (21)$$

El ajuste es mejor cuanto más se acerque a cero aunque, como es una suma de residuos no puede compararse entre modelos con diferente número de datos, pero sí para comparar el ajuste de cada modelo a diferentes concentraciones.

- R-Square: también denominado raíz cuadrada del coeficiente de múltiple correlación o coeficiente de múltiple determinación:

$$Rsquare = \frac{\sum_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (22)$$

Sólo toma valores entre 0 y 1. Relaciona la varianza explicada por el modelo (numerador) con la varianza observada (denominador), siendo por tanto deseables valores cercanos a 1. El valor de R-Square puede aumentar si se incrementa el número de parámetros del modelo (aunque esto no implique forzosamente un mejor ajuste), por lo que es preferible no usarlo para comparar modelos con diferente número de parámetros.

- Adjusted R-Square: tiene en cuenta los grados de libertad dados por la diferencia entre el número de datos n y el número de parámetros a estimar m :

$$Adjusted\ Rsquare = 1 - \frac{(n-1) \cdot \sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{(n-m) \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad (23)$$

Es una variación del R-Square que “penaliza” el uso de un mayor número de parámetros en relación al número de datos observados, pudiendo utilizarse por lo tanto para comparar modelos con diferente número de parámetros y/o datos. [26]

- RMSE (Root Mean Squared Error): también conocido como error estándar del ajuste.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_i (\hat{y}_i - y_i)^2}{n-m}} \quad (24)$$

Un valor de RMSE cercano a cero indica un mejor ajuste de los datos al modelo y permite la comparación de ajustes entre modelos con diferente número de datos utilizados.

Los resultados para cada modelo y concentración se recogen en la siguiente tabla:

MODELO		3 mg/l	4 mg/l	5 mg/l	6 mg/l	7 mg/l
Gehan-Siddiqui	SSE	0.0065	0.0338	0.0286	0.0738	0.0563
	RMSE	0.0360	0.0822	0.0509	0.0784	0.0791
	R-Square	0.8076	0.8487	0.9722	0.9426	0.9511
	Ad.R-Square	0.9427	0.8869	0.9696	0.9535	0.9457
DEBtox	SSE	0.0319	0.0864	0.1190	0.0425	0.0338
	RMSE	0.0799	0.1697	0.1150	0.0652	0.0695
	R-Square	0.7653	0.7588	0.8840	0.9753	0.9706
	Ad.R-Square	0.7184	0.5177	0.8453	0.9679	0.9581
Dos Weibull	SSE	0.0019	0.0042	0.0016	0.0024	0.0033
	RMSE	0.0251	0.0461	0.0142	0.0162	0.0234
	R-Square	0.9861	0.9644	0.9984	0.9986	0.9952
	Ad.R-Square	0.9721	0.9881	0.9977	0.9980	0.9952

Tabla 8: bondad de ajuste de los tres modelos analizados: método de Gehan y Siddiqui, teoría DEB y aproximación a una combinación de dos distribuciones de Weibull. El mejor ajuste para RMSE, y Adjusted R-Square se resalta en verde y el peor en azul.

En la tabla 8 puede apreciarse que la combinación de dos distribuciones Weibull ajustada por mínimos cuadrados aporta los mejores valores de RMSE y Adjusted R- Square para todas las concentraciones. El peor ajuste es el del software DEBtox para concentraciones de 3-4-5 mg/l, y el de Gehan y Siddiqui para 6-7 mg/l, aunque a altas concentraciones todos los modelos proporcionan un ajuste adecuado.

SSE puede compararse entre las distintas concentraciones de cada modelo, así como entre el método de Gehan y Siddiqui y la combinación de dos Weibull (por utilizar el mismo número de datos), pero no éstas con DEBtox. No obstante, es significativo que siendo DEBtox la que menos datos utiliza alcance el mayor valor de SSE para 3-4-5 mg/l.

4.2. Método de Gehan y Siddiqui modificado

La aplicación del método de Gehan y Siddiqui habría llevado a una distribución exponencial para todas las concentraciones (esto es, se aceptaría ésta como la hipótesis nula). Es decir, a una tasa de riesgo constante en el tiempo, lo que no parece concordar con la bajada en dos etapas que se aprecia en la Fig. 5.

Por otro lado, la modificación de este método para utilizar la curva que dé un mejor ajuste en cada concentración tampoco ha resultado muy eficiente: el análisis cuantitativo no coincide totalmente con los otros dos métodos y la diferencia entre distribuciones a cada concentración dificultan un análisis cualitativo.

4.3. Modelo biológico DEBtox

Como se ha señalado en el apartado 3.4 este modelo ajusta la curva de supervivencia a una expresión parametrizada con la concentración. Sin embargo, la concentración de no efecto o NOEC proporcionada es mayor de 3mg/l, por lo que la función de supervivencia a esta concentración se reduce a una función exponencial simple, tal como se recoge en la expresión (13) del apartado 2.3.2.2.

Otra consecuencia de que el NOEC sea mayor de 3mg/l es que DEBtox no proporciona el LT50 para esta concentración.

Este software exige los mismos intervalos temporales para todas las concentraciones, lo cual no es práctico cuando se quiere comparar un amplio abanico de ellas, ya que las medidas no siempre se realizan a iguales tiempos. Lógicamente concentraciones mayores exigen intervalos temporales más cortos y prescindir de todas las medidas no comunes conlleva pérdida de información.

Para comprobar esta variabilidad se realizó una validación cruzada, retirando las concentraciones de una en una y utilizando los datos de 6 intervalos temporales comunes. También se realizaron los cálculos con todos los datos a intervalos comunes de 5-6-7 mg/l, que se elevan a 13 datos por concentración. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Concentraciones utilizadas	C-4-5-6-7 mg/l	C-3-5-6-7 mg/l	C-3-4-6-7 mg/l	C-3-4-5-7 mg/l	C-3-4-5-6 mg/l	C-3-4-5-6-7 mg/l	C-3-4 mg/l	C-5-6-7 mg/l	Desv. típica
Nº intervalos	6	6	6	6	6	6	6	13	---
NOEC (mg/l)	3.57	4.06	3.60	3.61	3.56	3.57	2.59	4.13	0.4652
k_* (l·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)	0.01590	0.02023	0.01678	0.01522	0.01507	0.01570	0.005041	0.02229	0.0051
k_a (h ⁻¹)	0.1476	0.1587	0.1447	0.1590	0.1358	0.1453	0.1111	0.1542	0.0156
λ (h ⁻¹)	0.00240	0.00302	0.00298	0.00296	0.00295	0.00320	0.00239	0.00245	0.00035

Tabla 9: resultados de DEBtox usando distintos sets de datos. Las cantidades resaltadas en azul corresponden al valor máximo y en verde al mínimo obtenido para cada parámetro.

La tasa de mortalidad base o de control, λ , resultó ser el dato más estable mientras que los cambios más relevantes fueron los de la concentración de no efecto NOEC, uno de los valores más importantes en Toxicología, que oscila entre 2.59 y 4.13 mg/l.

Casi la totalidad de los valores extremos obtenidos para cada parámetro corresponden a los cálculos realizados con 3-4 mg/l y 5-6-7 mg/l. En este último se contaba con más del doble de datos que en el resto, lo que debería suponer resultados más precisos, pero también se aprecia que retirar los datos de 4mg/l eleva el resultado del NOEC incluso con menos datos.

El software no indica un número mínimo de tiempos o concentraciones necesario para obtener una buena estimación de modo que, aunque a la hora de comparar con los otros modelos se han considerado los resultados obtenidos con todas las concentraciones, las diferencias revelan la falta de exactitud del modelo. La teoría DEB a través del software DEBtox ha proporcionado un ajuste aceptable de las curvas, si bien el peor de todos, pero la concentración de no efecto o NOEC no es fiable, ya que depende en gran medida del número de concentraciones suministrado. En algunos ensayos se persigue precisamente este dato, que nos daría la máxima concentración posible del tóxico sin dañar al animal y que se tiene en cuenta a la hora de redactar las leyes sobre medio ambiente, por lo que la variabilidad del NOEC con los datos constituye un hándicap importante.

Los modelos biológicos actuales representan un gran avance en la medida en que consideran el mecanismo toxicológico subyacente en la supervivencia, y permiten relacionar ésta con alteraciones en el crecimiento o la reproducción cuando se realiza un estudio conjunto de estos parámetros. Se obtiene así información de

indudable valor sobre todo el ciclo vital del organismo que los modelos exclusivamente estadísticos no proporcionan.

No obstante en estos primeros modelos biológicos han primado la simplicidad y la posibilidad de una aplicación general. De hecho la amplia aplicabilidad es el principal objetivo de los autores de la teoría DEB, y en este sentido invitan a los investigadores a particularizar el modelo al objeto de sus estudios [13,14]. Ciertamente es preciso extender estos modelos a otros más complejos y del mismo modo la OECD en su *Guía de aplicación del análisis estadístico a los datos de Ecotoxicidad* recomienda mayor investigación al respecto [8].

4.4. Combinación de dos distribuciones tipo Weibull

En la tabla 9 se aprecia un ajuste superior a los dos modelos anteriores. Este sistema por lo tanto nos proporciona una herramienta eficaz para analizar cualitativamente lo que ocurre en el insecto a diferentes concentraciones.

La etapa de meseta de las primeras horas que se aprecia en la Fig.6 para todas las concentraciones puede corresponder al tiempo necesario para la absorción inicial del BPA. Aunque son necesarios estudios posteriores, se podría especular que la primera bajada de las curvas, hasta las 24-36 horas, coincidiera con la primera fase de metabolización, caracterizada por la descomposición del tóxico en compuestos polares menores o metabolitos. La segunda parte de la curva, de pendiente menor, podría estar relacionada con la eliminación del compuesto. Sin embargo no se conoce con exactitud el proceso de detoxificación del *Chironomus riparius*.

La separación de los dos sumandos (cada uno correspondiente a una distribución Weibull) muestra algunos aspectos interesantes que quizás, según avance el conocimiento del animal y su toxicodinámica, puedan aportar en el futuro información relevante:

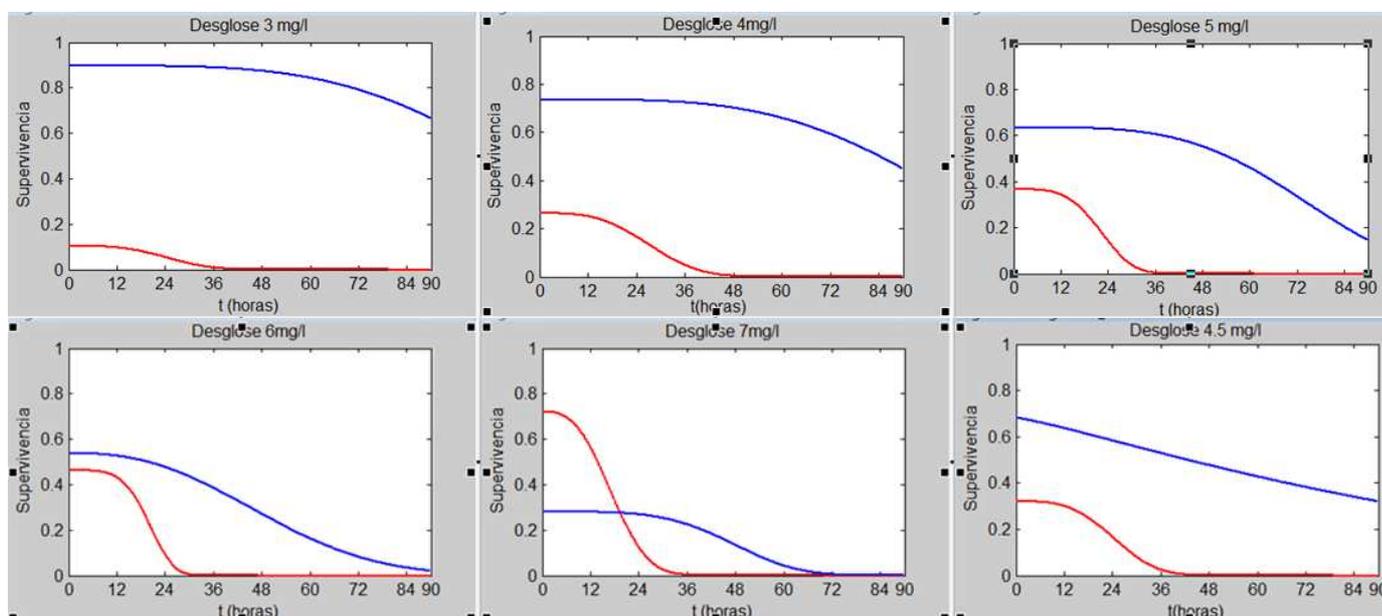


Fig. 7: separación para cada concentración de los dos sumandos de la distribución combinación de dos Weibull. En la esquina inferior derecha aparece el caso especial de 4.5 mg/l con larvas de menor tamaño, comentado en el apartado 4.4.

Según este desglose el efecto podría dividirse en una parte más homogénea a lo largo de todo el tiempo observado (representada en azul en la Fig.7) y un segundo factor (en rojo) que disminuye la supervivencia dramáticamente, pero su efecto se limita a las 36 horas aproximadamente. La importancia relativa de este segundo término aumenta con la concentración, siendo el más relevante para la concentración de 7mg/l.

Relacionar ambos fenómenos con la biología del *Chironomus* es aventurarse demasiado, dado el escaso conocimiento que se posee aún sobre los mecanismos concretos de detoxificación del animal. Podría tratarse de dos mecanismos diferentes, o de las dos fases regulares de metabolización a semejanza de otras especies [27]. También puede que la fase moderada (azul) represente la parte del BPA que puede ser eliminada por el mosquito, mientras que el segundo factor (representado en rojo) constituya el efecto ocasionado por la cantidad excesiva de BPA que no ha conseguido eliminarse. Sería necesaria más investigación al respecto y aguardar a los avances a nivel molecular, bioquímico y fisiológico de *Chironomus*.

No se consiguió relacionar cuantitativamente los parámetros de las diferentes curvas, ni entre ellas ni con la concentración, salvo para el coeficiente a_1 (los coeficientes de ambos sumandos son a_1 y $(1-a_1)$), que se pudo ajustar con un RMSE=0.0252 a la ecuación de la recta:

$$a_1 = 0.151 \cdot c - 0.356 \quad (25)$$

tal y como se aprecia en la Fig. 8:

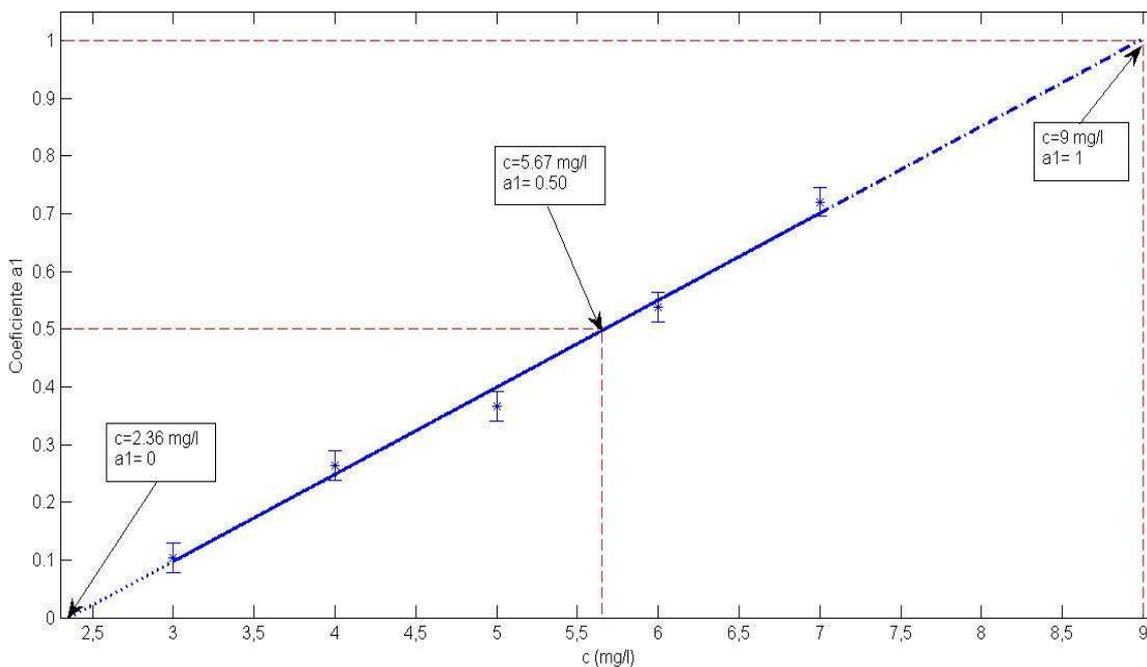


Fig. 8: Ajuste del coeficiente a_1 a una recta y extrapolación de los casos $a_1=0, 0.5, 1$. Las barras de error corresponden al RMSE.

Si bien sólo con este dato no se puede predecir la curva de supervivencia para una concentración dada sí permite en cambio predecir la proporción de muertes que se va a deber a uno u otro fenómeno, dato que puede ser muy interesante cuando se sepa más sobre cada uno de ellos. De este modo por extrapolación se estiman los siguientes datos:

- Para $a_1=1$ se estima una concentración $c=9$ mg/l, es decir, a partir de esa concentración todas las larvas morirían por el efecto abrupto (identificado en rojo en la Fig. 8) en menos de 36-40 horas aproximadamente.

- Para $a_1 = 0.5$ la concentración estimada es de 5.67mg/l. Luego a esta concentración la mitad de las larvas morirían por cada uno de los dos procesos.
- Para $a_1 = 0$ la concentración correspondiente es de 2.36 mg/l, a la cual ninguna larva moriría por el proceso abrupto antes de las 36 horas, sino que la supervivencia seguiría el proceso lento identificado en la Fig. 8 en azul. Este valor de 2.30 mg/l sugiere que esta concentración podría estar relacionada con la concentración de no efecto NOEC. Si fuera así se podría pensar que el sumando correspondiente al descenso homogéneo estaría relacionado con la mortalidad base.

De la misma manera se podría calcular la concentración a la que muere por cada fenómeno un porcentaje de larvas dado.

El ajuste a una combinación de distribuciones de Weibull proporciona la mejor bondad de ajuste (en el sentido de los mínimos cuadrados). Sugiere además la existencia de dos procesos diferentes de detoxificación y consigue incluso predecir la fracción de larvas que morirá por cada uno de ellos. Sin embargo se trata de un modelo heurístico, no basado en hipótesis biológicas o toxicológicas fundamentales, que proporciona ayuda en un análisis cualitativo.

4.5. Efecto del tamaño de la larva en el caso de 4.5 mg/l

Se realizó un ensayo con 3 réplicas de 50 larvas cada una en una concentración de 4.5 mg/l de BPA, siguiendo el mismo protocolo utilizado para las otras concentraciones, referido en los apartados 2.1 y 2.2. Aunque todas las larvas eran de cuarto estadio se apreciaba a simple vista que su tamaño medio era claramente menor al de los otros ensayos, debido a las limitaciones en la disponibilidad de animales en el laboratorio. En un principio se pensó en desestimar el experimento pero finalmente se consideró llevarlo a cabo y observar las diferencias en los resultados respecto a los demás casos.

Puesto que el método de Gehan y Siddiqui ya había asignado diferentes curvas según la concentración, y en este caso de 4.5 mg/l el objetivo principal era de comparación con las otras concentraciones, se aplicó el software de DEBtox y el ajuste a una combinación de distribuciones de Weibull.

En el caso de DEBtox las diferencias en las tasas de muerte y eliminación fueron sustanciales, mientras que el riesgo basal resultó similar, posiblemente debido a que la necesidad de adjuntar como mínimo dos series de datos hizo preciso introducir los datos de control.

	Tasa de muerte k_d	Tasa de eliminación k_a	Riesgo basal	NOEC
4.5 mg/l	1.1340 l·mg ⁻¹ h ⁻¹	0.7311 h ⁻¹	0.0029 h ⁻¹	4.49 mg/l
3-4-5-6-7 mg/l	0.0157 l·mg ⁻¹ h ⁻¹	0.1453 h ⁻¹	0.0032 h ⁻¹	3.57 mg/l

Tabla 10: comparación de los parámetros obtenidos con el software DEBtox en los ensayos principales y con larvas más pequeñas a 4.5 mg/l.

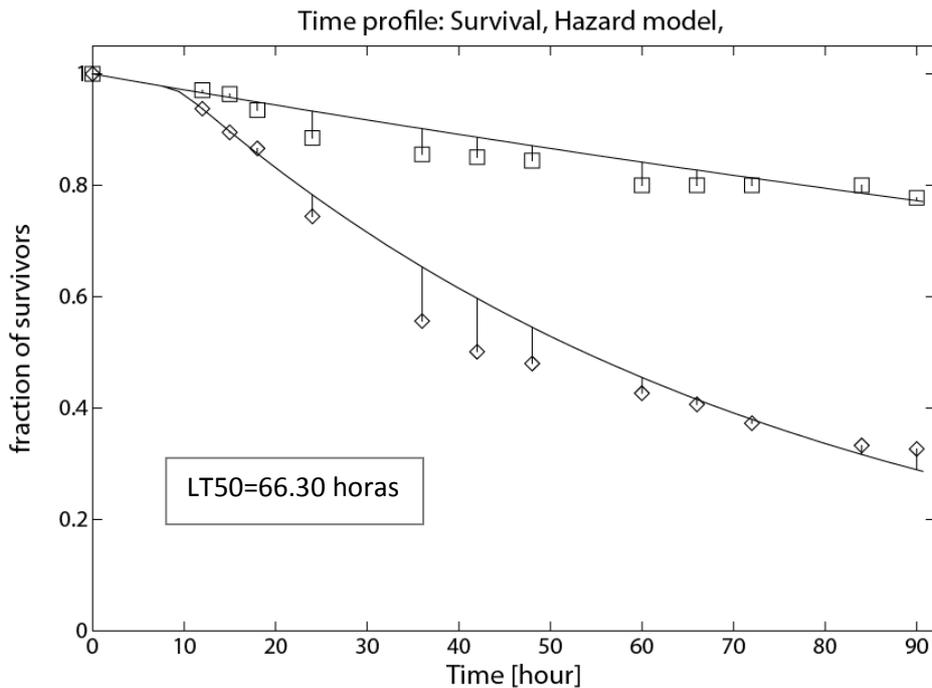


Fig. 9: gráfica de supervivencia calculada por DEBtox para 4.5 mg/l de bisfenol.

La tasa de eliminación k_a con larvas de menor tamaño es 5 veces mayor y la tasa de muerte k_+ 72 veces mayor que lo obtenido en los ensayos con larvas de tamaño medio.

Como se expuso en el apartado 2.3.2.2 la tasa de muerte es proporcional al cociente entre la tasa de absorción y la de eliminación:

$$k_+ \propto \frac{k_u}{k_a}$$

De modo que atendiendo a los resultados de DEBtox, el espectacular aumento de la tasa de muerte se debe a un aumento aún mayor de la tasa de absorción.

La absorción se realiza se realiza por vía cutánea, respiratoria (espiráculos ubicados en la superficie corporal) y digestiva. En las larvas menores la proporción superficie/volumen del animal aumenta, lo que puede estar relacionado con el aumento de la absorción.

Esta idea se percibe también en el ajuste de los datos de 4.5 mg/l a una combinación de distribuciones de Weibull.

En la Fig.10 se ve la diferencia en la forma de la curva de 4.5 mg/l en comparación con el resto, cruzándose en las primeras horas con las curvas de mayor concentración. La supervivencia ha disminuido en estas primeras horas en las que se produce la fase de absorción, lo que concuerda con las conclusiones obtenidas a partir del modelo DEB: la tasa de absorción aumenta drásticamente en larvas de menor tamaño.

La supervivencia se estabiliza en las horas siguientes y parece incluso solaparse con la curva de 4mg/l a partir de las 90 horas, pero serían necesarios datos a tiempos más largos para constatarlo.

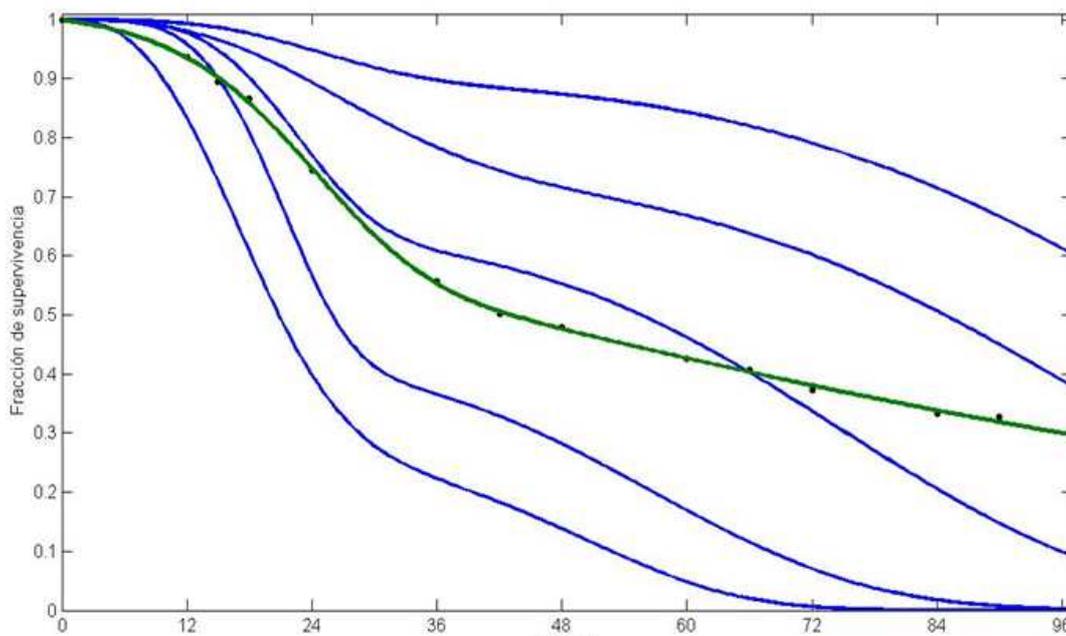


Fig. 10: representación de la curva de supervivencia de 4.5 mg/l como combinación de Weibull, en verde, frente a las curvas de las demás concentraciones, en azul y de arriba abajo 3-4-5-6-7 mg/l.

En cuanto al desglose de los dos sumandos Weibull (Fig. 7) la parte de descenso abrupto (en rojo) sigue la misma tónica que las concentraciones de 4 y 5 mg/l. Es el descenso homogéneo (en azul) el que varía respecto a las otras concentraciones, lo que puede indicar que el tamaño larvario, y por tanto la absorción del tóxico por el organismo, determinarían precisamente ese término.

En cambio, la proporción de muertes por uno y otro proceso sigue el mismo patrón que en las concentraciones utilizadas con larvas mayores. El valor de a_1 obtenido en el ajuste a la curva suma de Weibull para 4.5 mg/l es de 0.3195, mientras que el estimado a partir de la recta de la expresión (25) es 0.3228 lo que por un lado ratifica el valor predictivo de este modelo y por otro indica que el proceso homogéneo resulta afectado por el tamaño larvario, pero no así la relación entre muertes por uno y otro proceso.

Por medio de este caso de 4.5 mg/l se ha comprobado la utilidad del modelo biológico y el ajuste a la suma de dos Weibull para explicar diferencias en la supervivencia de ensayos alternativos, coincidiendo en el análisis de supervivencia de larvas de menor tamaño. Es un análisis cualitativo, ya que el “menor tamaño” no se midió ni cuantificó de ninguna forma, pero la constatación de su relevancia anima a incluir esta variable en próximas investigaciones.

5. CONCLUSIONES

Se ha estudiado la supervivencia del *Chironomus riparius* a BPA mediante dos métodos estadísticos paramétricos y un modelo biológico comparando las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.

1. Valores como la LT50 pueden calcularse con facilidad a partir de cualquiera de los tres modelos y el software DEBtox permite incluso predecir su valor para otras concentraciones. No obstante se han obtenido resultados diferentes para cada método, poniendo en entredicho su fiabilidad.
2. El mejor ajuste se obtuvo con una combinación de distribuciones Weibull temporales, lo que permite un mejor análisis cualitativo de la evolución de la supervivencia en el tiempo y en este sentido puede resultar de mayor ayuda a los biólogos. La bondad de ajuste es también la mejor de los tres métodos testados, por lo que la estimación de LTx sería la más fiable.
3. El estudio complementario del modelo biológico y la suma de dos distribuciones Weibull proporciona un análisis cualitativo muy interesante, como se ha mostrado en el caso de la influencia del tamaño de la larva para 4.5 mg/l.
4. El buen ajuste a una combinación de distribuciones Weibull apunta a la existencia de dos fenómenos dentro del proceso de detoxificación: uno abrupto que finaliza hacia las 36 horas y aumenta con la concentración y otro más lento que predomina a concentraciones bajas.
5. Ninguno de los métodos predice correctamente la curva de supervivencia para diferentes concentraciones. Sin embargo la combinación de distribuciones Weibull predice la proporción de larvas que morirán por el efecto de cada uno de los dos sumandos.

6. TRABAJOS FUTUROS

Los modelos biológicos como el DEBtox son por su planteamiento el camino a seguir en el futuro, incorporando el conocimiento actual en biología, genómica, toxicología, bioquímica e incluso física al modelo matemático que le da soporte. Sin embargo aún se debe trabajar en sus carencias y adaptarlo a cada especie e incluso, si nuevas evidencias lo consideraran necesario, a cada tipo de compuesto.

Estos son algunos de los puntos que podrían tratarse en futuros modelos:

- El modelo monocompartimental utilizado en la teoría DEB considera el flujo de acumulación del compuesto en el organismo proporcional a la concentración en el medio, y el flujo de eliminación proporcional a la concentración en el organismo. Este modelo debe revisarse y ser remplazado por un modelo multicompartimental⁴ más complejo a semejanza de los utilizados en Farmacocinética [28-30], siempre que el conocimiento del metabolismo del animal lo justifique. En este sentido los constantes trabajos a nivel molecular, bioquímico y fisiológico de *Chironomus* pueden resultar de gran ayuda.

- Aunque el punto de partida de la teoría DEB es individual, es decir, se parte del metabolismo del agente tóxico por el individuo, no se contemplan diferencias entre individuos. En este trabajo se ha visto la importancia de factores como el tamaño, obteniendo resultados diferentes según el tamaño larvario, a pesar de que todos los individuos estaban en el mismo estadio y compartiendo por tanto la misma fisiología básica.

- Si el organismo crece durante la exposición o cambia el porcentaje en lípidos de su composición (por ejemplo por cambios en su dieta) el metabolismo del compuesto puede verse afectado y desviarse de la sencilla cinética de primer orden utilizada en DEBtox [16].

⁴ El modelo bicompartmental considera un compartimento central que representa fluidos y órganos a los que el compuesto accede más rápidamente y otro periférico de perfusión más lenta.

Además podrían incluirse en medida de lo posible las particularidades del organismo a estudio e incluso del compuesto⁵ o, en un proyecto más ambicioso y sujeto al futuro conocimiento de las interacciones a nivel molecular, modelar dichas interacciones ligando-receptor, como ya se ha empezado a hacer con mamíferos en la industria farmacéutica. [31-34].

Es una tarea difícil por diversas razones, entre las que se encuentran:

- Requiere de técnicas más costosas y complicadas en el laboratorio, para medir con exactitud la absorción y eliminación del compuesto, ya que no pueden utilizarse medios más sencillos habituales con animales superiores, como los análisis de sangre u orina.
- La consideración de nuevos aspectos como el tamaño y las características específicas de cada especie debe realizarse sin aumentar innecesariamente el número de parámetros a calcular, encontrando el equilibrio entre fiabilidad y simplicidad del modelo matemático.

La investigación en nuevos modelos biológicos de toxicocinética específicos para insectos constituye un campo multidisciplinar, moderno y no exento de retos.

⁵ Por ejemplo, la primera fase de metabolización del tóxico varía dependiendo de que sea polar o apolar.

REFERENCIAS

1. **Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos.** Javier Alba-Tercedor. Dpto. biología animal y Ecología de la Universidad de Granada. IV Simposio del Agua en Andalucía, Almería 1996, Vol. II: 203-213.
2. **Chironomid sediment toxicity test, ecological effects tests guidelines.** EPA (US). 1996. EPA 712-C-96-313; 2nd ed. EPA 600/R-99/064, Washington DC, USA.
3. **Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals, sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment.** 218. OECD, 2001
4. **Biological indicators of freshwater pollution and environmental management.** Hellawell J., 1986. Elsevier Applied Science Publ. 546p London & New York
5. **Metodología para el Establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua en la Confederación Hidrográfica del Ebro. Protocolo de muestreo y análisis para invertebrados bentónicos.** J. Alba-Tercedor et Al. Ministerio de Medio Ambiente, 2004.
6. **Classification of surface water quality. Review of the schemes used in EC Member States.** Heinemann, Oxford 1988
7. **Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrate communities; history and present status in Europe.** Environment Pollution, 60. pp.101-139, 1989.
8. **Current Approaches In The Statistical Analysis Of Ecotoxicity Data: A Guidance To Application.** OECD Environment Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No 54. Paris 2006.
9. **Survival Models and Data Analysis.** Regina C. Elandt Johnson y Norman L. Johnson. Wiley series in probability and Mathematical Statistics.1980
10. **Statistical Analysis of Bioassays based on hazard modelling.** J.J.M. Bedaux y S.A.L.M. Kooijman. Environmental and Ecological Statistics 1994, 1:303-314
11. **Survival Analysis.** Stephen P. Jenkins. Tutorial del curso "Survival analysis" del *Institute for Social and Economic Research*, University of Essex, U.K.
12. **Survival Analysis.** Germán Rodríguez. Tutorial del curso "Survival analysis". Office of Population Research, Princeton University. USA. Time
13. **Aplicación del método de Regresión de Gehan Siddiqui y el test de la F de Cox en el análisis de datos de supervivencia.** Tarín JJ. Y Mensua J.L. Dpto. de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia. *Qüestiió* Vol.13 nº1,2, 3 pp. 83-93, 1989
14. **Ecotoxicology and Population Dynamics: Using DEBtox models in a Leslie modelling approach.** C. Lopes et Al. Ecological Modelling 188 (2005) 30-40
15. **An introduction to Dynamic Energy Budget (DEB) models with special emphasis on parameter estimation.** Jaar van Der Meer. Journal of Sea Research 56 (2006) 85-102.
16. **Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems.** Kooijman S.A.L.M. (2000) - Cambridge University Press
17. **The chironomid full life-cycle test .Validation report.** Lennart Weltje¹and Eric Bruns²
1 BASF SE, Crop Protection - Ecotoxicology, Limburgerhof, Germany ; 2 Bayer Crop Science AG, BCS AG-D-ETX, Monheim, Germany . November 2008
18. **Human exposure to bisphenol A.** Jeong-Hun Kang, Fusao Kondo, Yoshiki Katayama. Toxicology 226 (2006) 79-89.
19. **Evaluación de la exposición al Bisfenol A en población infantil de la provincia de Granada e identificación de factores asociados.** Tesis doctoral, abril 2010. Antonio Miguel Ruiz Montes, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.
20. **Bisphenol A degradation in seawater is different from that in river water.** Jeong-Hun Kanga and Fusao Kondob. Chemosphere Volume 60, Issue 9, September 2005, Pages 1288-1292.
21. **Bisphenol A Action Plan.** U.S. Environmental Protection Agency, 2010. (CASRN 80-05-7).
22. **Occurrence of Bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements.** Angélique Belfroid et al. Chemosphere. Volume 49, Issue 1, October 2002, Pages 97-103.
23. **Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain).** Raquel Céspedes et al. Chemosphere. Volume 61, Issue 11, December 2005, Pages 1710-1719.
24. **Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus.** Dodds EC, Lawson W. Nature, 1936; 137:996.
25. **Chapel Hill Bisphenol A Expert Panel Consensus Statement: Integration of Mechanisms, Effects in Animals and Potential to Impact Human Health at Current Levels of Exposure.** Frederik S. Vom Saal et al. Reproductive Toxicology 24(2): 2007
26. **Simple Regression Methods for Survival Time Studies.** Edmund A. Gehan and M. M. Siddiqui. Journal of The American Statistical Association 68 (344):848-856; 1973.
27. **Introductory econometrics: a modern approach.** Jeffrey M. Wooldridge. Ed. South Western, Cengage Learning, USA, 2009.
28. **Farmacología básica y clínica de Velázquez.** P. Lorenzo. Ed. Panamericana, 18ª edición.
29. **Farmacocinética.** Milo Gibaldi y Donald Perrier. Editorial Reverté S.A.

30. **Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Homogeneous and Heterogeneous Approaches.** Panos Macheras and Athanassios Iliadis. Serie *Interdisciplinary applied Mathematics*, vol. 30. Springer.
31. **Challenges in the Transition to Model-Based Development.** Thaddeus H. Grasela et al. *The AAPS Journal* 2005; 7 (2) Article 49.
32. **Computer-aided drug discovery and development.** I. M. Kapetanovic. *Chem. Biol. Interact.* 2008 January 30; 171(2): 165–176.
33. **Semi-mechanistic modelling of the tumour growth inhibitory effects of LY2157299, a new type I receptor TGF- β kinase antagonist, in mice.** Lorea Bueno et Al. *European Journal of Cancer* 44 (2008), 142-150.
34. **Modeling binding equilibrium in a competitive estrogen receptor binding assay.** Jung-Hwan Kwon et al. *Chemosphere* Volume 69, Issue 7, October 2007, Pages 1025-1031.
35. **Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme activities, growth and development in the fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae).** Se-Bum Lee, Jinhee Choi 1999.
36. **Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project.** H. Segner et al. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (2003) 302-314
37. **Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene.** Kiyun Park and Inn-SilKwak. *Chemosphere* Volume 79, Issue 9, May 2010, Pages 934-941