

Vida Científica

COLABORACIONES EN CIENCIAS DE LA NATURALEZA

ECOTOXICOLOGÍA I: CUANDO NO PODEMOS ESCAPAR DE LOS TÓXICOS

La búsqueda de la sociedad del bienestar ha llevado, entre otras consecuencias, a una continua demanda de nuevos materiales, favoreciendo un constante desarrollo en la síntesis de compuestos químicos. Así mismo, la actividad industrial ha aumentado de forma considerable en las últimas décadas lo que ha provocado una mayor producción de distintas sustancias empleadas en sectores como la ingeniería, agricultura, industria alimentaria, electrónica, etc. Como consecuencia se ha visto incrementada la cantidad de productos químicos contaminantes en el ambiente y que entran en contacto tanto con los seres humanos como con el resto de la biota.

El desarrollo de nuevos compuestos supone avances que facilitan nuestra vida diaria, pero también pueden tener consecuencias negativas. En general, la producción de todas estas sustancias químicas va por delante del conocimiento de los efectos que pueden provocar sobre los seres vivos. En nuestra vida cotidiana estamos sometidos a un cóctel de compuestos de los cuales se desconocen las consecuencias que pueden tener sobre nosotros mismos y sobre las generaciones futuras. Lo que hace realmente importante estudiar no sólo los efectos que pueden llegar a provocar sobre los seres humanos y los ecosistemas sino también mejorar los protocolos y técnicas de detección de dichas sustancias.

De la misma manera que avanza la síntesis de nuevas sustancias a las que estamos siendo expuestos, debe avanzar el conocimiento de los efectos que tienen sobre los seres vivos. Por este motivo, se desarrollan diferentes estudios toxicológicos que permiten evaluar el riesgo o peligro que un agente físico o químico puede ocasionar sobre nuestra salud o el medio ambiente. Este conocimiento debe estar al servicio de la sociedad, no sólo para que seamos conscientes de los potenciales peligros que puede causar el consumo y exposición de determinados compuestos sino para poder exigir a las autoridades la

regulación de la producción y uso de las sustancias con mayor potencial tóxico.

CONTAMINACIÓN

El medio ambiente se ve afectado por la liberación de compuestos como consecuencia de la actividad humana, siendo los ecosistemas acuáticos los más vulnerables por ser uno de los principales focos de vertido; en ellos los contaminantes se integran en un ciclo que incluye el agua, los sedimentos y los seres vivos, sobre los que se han observado principalmente sus consecuencias.

Los contaminantes son agentes externos ajenos al medio que provocan alteraciones en los ecosistemas y en el correcto funcionamiento de los seres vivos. Estos compuestos pueden tener un origen natural o ser sintetizados de forma artificial (xenobióticos), como los pesticidas, plastificantes, conservantes, etc.

Estos compuestos son liberados a los ecosistemas por distintas vías a través de aguas residuales industriales o domésticas, vertidos accidentales, desechos de fábricas, etc. Una vez introducidos en el medio ambiente pueden integrarse en la cadena alimentaria, por lo que especies que no están en contacto directo con zonas contaminadas pueden verse expuestas a través de la ingestión de seres vivos contaminados, favoreciendo así la bioacumulación (aumento de la concentración de un compuesto en un tejido con el paso del tiempo) y biomagnificación (aumento de la concentración de un compuesto según se asciende en los niveles tróficos).

Los seres humanos podemos estar expuestos a la contaminación bien por contacto directo con estos compuestos o bien de forma indirecta a través del consumo de alimentos contaminados, como pesticidas utilizados en agricultura u hormonas o antibióticos en ganadería. También durante el procesamiento y almacenaje, los alimentos reciben sustancias químicas que acabamos ingiriendo, por ejemplo sustancias plastificantes de los envases o el estaño de las latas.

Además de la alimentación, el ser humano se ve sometido a una gran presión por parte de estos compuestos

químicos a través del aire, agua, cosméticos, etc. La absorción de los tóxicos puede darse por el sistema respiratorio, el tracto gastrointestinal o la piel. Una vez dentro del organismo los contaminantes pueden acumularse en diferentes tejidos; en el sistema nervioso y en los huesos se han descrito hasta 60 compuestos diferentes, y en el caso de las uñas y el pelo se han observado altas concentraciones de mercurio y plomo.

Los seres humanos, desde el momento de nuestro nacimiento, vivimos expuestos a un cóctel de sustancias químicas presentes en nuestro entorno. Los más vulnerables a dichos compuestos son los niños, en los cuales su desarrollo puede verse afectado debido a que aún no han completado la maduración de sus sistemas inmunológico, nervioso, endocrino, etc., además de poder provocar efectos negativos en etapas posteriores de su vida. Entre las enfermedades del ser humano relacionadas con la presencia de contaminantes ambientales se encuentran reacciones de hipersensibilidad, problemas inmunológicos, intoxicaciones agudas, problemas reproductivos y durante el embarazo, neurotoxicidad e incluso cáncer.

En la actualidad existen más de 85.000 sustancias químicas en el mercado y se estima que su volumen de producción aumente hasta el año 2030 en casi un 200% en los países BRIICS (Brasil, Rusia, India, Indonesia, China y Sudáfrica), un 58% en los países pertenecientes a la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) y un 121% en el resto del mundo [1]. Entre estos compuestos se encuentran pesticidas, plastificantes, filtros ultravioleta, bactericidas, de los que la mayoría de ellos se desconocen sus efectos sobre los seres vivos. A fecha de 2011 existían 847 compuestos químicos candidatos para formar parte de la Lista Prioritaria de Sustancias Peligrosas de la ATSDR de Estados Unidos (Agencia para las Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades), clasificados según su toxicidad, de los cuales sólo los 275 primeros compuestos se consideran sustancias prioritarias [2].

Existe un grupo de compuestos químicos conocidos como contaminantes orgánicos persistentes (COPs), caracterizados por ser compuestos tóxicos con estructura de carbono, que se mantienen en el ambiente durante largos periodos de tiempo sin verse alterados debido a que no se degradan bajo condiciones ambientales. Estos compuestos son semivolátiles y tienen baja solubilidad en agua, características

fisicoquímicas que les confieren la capacidad de dispersarse ampliamente por el planeta, pudiendo acumularse en zonas alejadas de su lugar de producción. Además, al ser solubles en lípidos, favorecen su acumulación en tejidos grasos de organismos vivos, incorporándose en la cadena alimentaria.

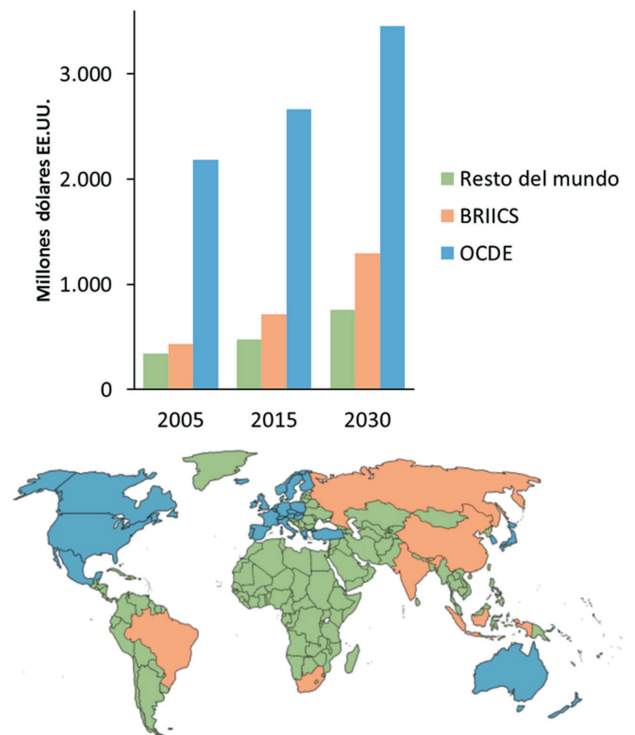


Figura 1. Aumento de producción en millones de dólares de sustancias químicas en países pertenecientes a la OCDE, países BRIICS (Brasil, Rusia, India, Indonesia, China y Sudáfrica) y el resto del mundo hasta el año 2030. Estimación realizada por la OCDE en 2008.

DISRUPTORES ENDOCRINOS

Un grupo de compuestos químicos, principalmente xenobióticos, son capaces de imitar la acción de las hormonas naturales y provocar un desequilibrio en el correcto funcionamiento del sistema hormonal de los seres vivos. Estas sustancias conocidas como disruptores endocrinos (del inglés, *endocrine disruptors*) pueden actuar a distintos niveles dependiendo del sistema hormonal al que afecten (estrogénico, tiroideo, etc.) y del momento de exposición (desarrollo fetal, niñez, pubertad, etc.). Se han observado trastornos en la diferenciación y desarrollo sexual, alteraciones en la reproducción o cambios en los patrones de conducta provocados por este tipo de compuestos.

Tabla 1. Ejemplos de compuestos disruptores endocrinos y sus efectos en diferentes organismos.

Agente químico	Uso	Efectos
Cadmio	Metal pesado	Peces: crecimiento anormal Insectos: alteraciones de la reproducción
Dietilestilbestrol	Hormona de síntesis	Insectos: masculinización metabólica Mamíferos: tumores, disminución del número de espermatozoides
Ftalatos	Plastificantes	Mamíferos: atrofia testicular
Tributilina	Anti incrustante de barcos	Moluscos: imposex
Compuestos organoclorados	Pesticidas, surfactantes	Aves: masculinización, adelgazamiento de la cáscara del huevo Mamíferos: tumores, inmunodepresión, alteración de la reproducción
Fenoles	Plastificantes, antimicrobianos	Peces: inhibición del crecimiento Mamíferos: reducción del número de espermatozoides

Algunas de estas sustancias, como los metales pesados, el bisfenol-A, los ftalatos o los filtros ultravioleta, se han detectado en el ser humano en sangre, orina o leche materna haciendo evidente la necesidad de conocer los efectos de estas sustancias sobre nuestra salud tanto a corto como a largo plazo.

Los disruptores endocrinos pueden alterar el correcto funcionamiento del sistema hormonal mediante múltiples mecanismos. Actúan mimetizando la acción de la hormona natural, como se muestra en la figura 2, uniéndose al receptor celular y emulando su acción, bloqueando la acción de la hormona o bien incrementando o disminuyendo el efecto de ésta. Los disruptores endocrinos también pueden alterar la síntesis de hormonas, modificando su producción o degradación. Las distintas alteraciones provocadas por estas sustancias tóxicas desencadenan cambios en el correcto funcionamiento de los sistemas celulares que pueden llegar a observarse como alteraciones en distintos sistemas, como en el reproductor y endocrino, e incluso llegar a producir enfermedades como el cáncer.

La importancia de conocer los potenciales efectos de los disruptores endocrinos ha llevado al desarrollo de numerosos estudios en distintas especies animales. En dichos experimentos se ha demostrado, tras la exposición a diferentes compuestos, la aparición de anomalías en el desarrollo del tracto reproductor, disminución de la fertilidad y disminución en el proceso de incubación de tortugas, feminización y masculinización de peces, gasterópodos y aves, etc. Así mismo estos efectos también se han observado en poblaciones naturales que viven en ambientes contaminados, empleándose estos datos como bioindicadores de disrupción endocrina.

En los últimos 50 años se ha detectado un descenso del 50% en el número de espermatozoides de distintas poblaciones humanas estudiadas, además de observarse otros trastornos orgánicos y funcionales en el sistema reproductor femenino [3]. Incluso se ha relacionado la presencia de estos compuestos en nuestro entorno con un incremento en el número de abortos espontáneos y la incidencia y aparición cada vez más temprana de distintos tipos de cánceres de mama, ovarios y testicular [4].

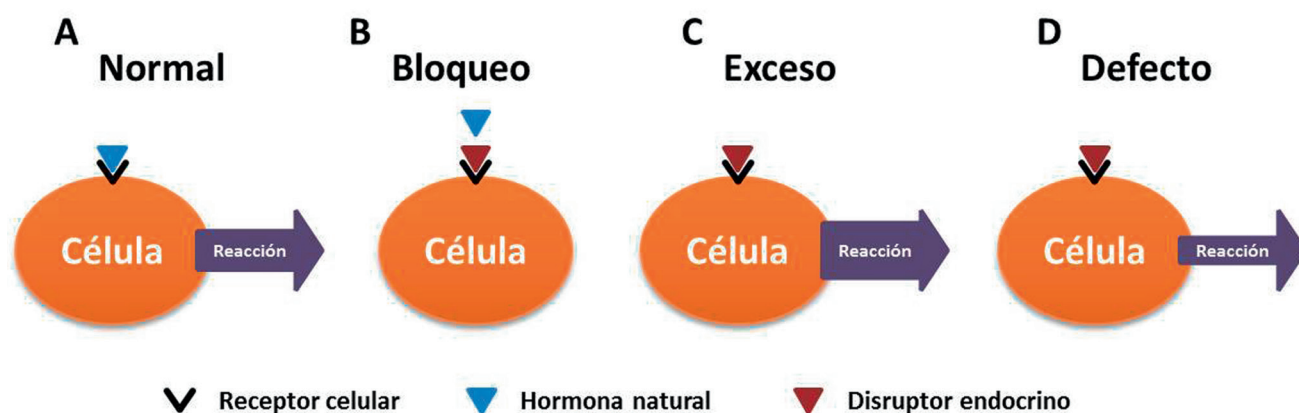


Figura 2. Esquema de la interacción entre el receptor, la hormona y el disruptor endocrino en: situación normal (A), bloqueando la reacción (B), potenciando la reacción (C) o haciéndola insuficiente (D)

Uno de los primeros ejemplos descritos de disruptores endocrinos fue el DDT (1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano), su metabolito el DDE (1,1-Dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano) y otros insecticidas organoclorados. Desde los primeros años de la utilización masiva del DDT como pesticida se empezó a describir en los animales que entraban en contacto con él efectos adversos sobre caracteres sexuales, alteraciones de la reproducción, disminución del grosor de la cáscara de los huevos de las aves, etc. [5]. En la década de 1980, en un lago norteamericano, se describieron anomalías en el aparato reproductor de cocodrilos machos y hembras, así como una disminución de la población, relacionado también con la presencia de DDT. Evidencias más recientes demostraron que estas sustancias se comportan como compuestos estrogénicos, mimetizando los efectos de las hormonas del propio organismo [6].

Otro caso de disruptor endocrino es el TBT (tributilestaño), empleado en las pinturas de revestimiento de los barcos debido a que impide la adhesión de moluscos y algas al casco. Durante la década de 1960 en la costa francesa se empezaron a apreciar malformaciones en la concha de las ostras y una disminución de la población. Cuando se restringió el uso del tributilestaño como revestimiento de barcos en varios países estos efectos disminuyeron [7]. En zonas productoras de mejillones, como Galicia, también se atribuyó al TBT el desarrollo de órganos masculinos en hembras y la pérdida de su capacidad reproductora [8].

Así mismo, algunos disruptores endocrinos se relacionaron en un primer momento con problemas en los seres humanos, como fue el caso del medicamento dietilstilbestrol (DES), utilizado entre 1920 y 1960 para prevenir abortos espontáneos. Tras años de administración, se observó en la década de 1970 un aumento en la incidencia de adenomas vaginales en mujeres de 14 a 22 años, cuya patología es infrecuente en menores de 30 años. Tras un estudio epidemiológico se relacionó la aparición de dichas afecciones con el tratamiento por parte de sus madres con este medicamento [9].

En la actualidad la lista de sustancias catalogadas como disruptores endocrinos es muy amplia, algunos de los cuales forman parte de nuestra vida cotidiana. Caben destacar como ejemplos los metales pesados (cadmio y plomo), pesticidas organoclorados (DDT, metoxicloro, clordecona, endosulfán, toxafeno) y derivados industriales (alquifenoles, bifenilos policlorados, ftalatos, bisfenoles, filtros ultravioleta, etc.).

Organismos internacionales como la OCDE, la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de EE.UU.) desarrollan programas de detección y sistemas de ensayos para evaluar los

efectos de sustancias catalogadas como potenciales disruptores endocrinos con el fin de restringir su utilización y producción. El número de compuestos químicos con actividad disruptora endocrina se incrementa día a día, actualmente la lista publicada por la Comisión Europea incluye más de 500 sustancias candidatas con potencial capacidad de disrupción endocrina [10].

ENSAYOS TOXICOLÓGICOS

Desde la prehistoria, el hombre ha tenido conocimiento de la existencia de propiedades tóxicas de plantas, animales y minerales, empleando diferentes venenos como arma de caza. Se han encontrado en tablillas de barro de más de 4000 años de antigüedad referencias al arsénico y en el *Papiro de Ebers*, datado en el 1500 antes de Cristo, la documentación escrita más antigua sobre medicamentos y venenos, entre ellos el plomo, opio y acónito. Ya en el Siglo XV Paracelso habló del concepto de dosis, empleando sustancias reconocidas como tóxicas a modo de medicamentos, siendo suyo el concepto de *dosis sola facit venenum* (la dosis hace al veneno). El médico español Mateo Orfila, considerado como el padre de la toxicología, escribió en 1814 *Traité des poisons tirés des règnes minéral, végétal et animal; ou, Toxicologie générale (Tratado de venenos, derivados del reino mineral, vegetal y animal; o, Toxicología general)*, que se convirtió en una de las principales obras de referencia de la toxicología europea. Gracias al gran avance de la biología, en la actualidad se empieza a interpretar la toxicología a nivel molecular y a estudiar cómo las sustancias tóxicas interaccionan con diferentes moléculas del sistema celular y a relacionarlo con sus efectos.

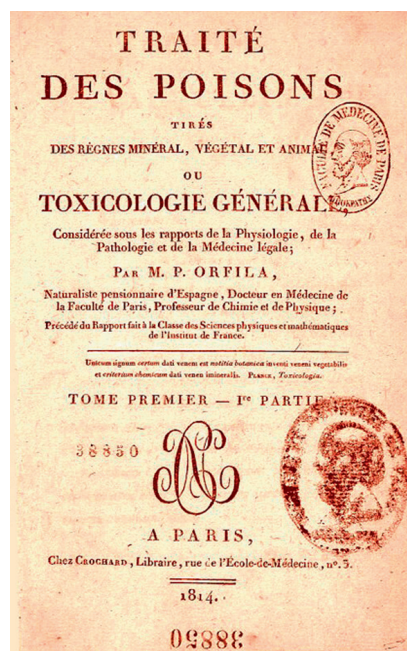


Figura 3. Portada del libro "Traité des poisons tirés des règnes minéral, végétal et animal; ou, Toxicologie générale", escrito en 1814 por Mateo Orfila.

Uno de los principales objetivos de los estudios toxicológicos es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser empleados como indicadores de exposición del organismo a sustancias tóxicas o indicadores de los efectos que producen o han producido estos compuestos sobre el individuo. En 1990 McCarthy y Shugart definieron biomarcador como *la medida a nivel molecular, bioquímico o celular en poblaciones naturales de hábitats contaminados o en individuos expuestos de forma experimental a los químicos, que indica que el organismo ha estado en contacto con compuestos tóxicos y la intensidad de la respuesta al contaminante en el organismo* [11]. En 1996 Van Gestel y Van Brummelen lo definieron para el caso de la ecotoxicología como *cualquier respuesta biológica frente a un químico ambiental a nivel sub-individual, medido en el organismo o en sus productos, indicando una alteración respecto a su estado normal, no pudiendo ser detectado a partir del organismo completo. De esta manera se puede restringir a parámetros bioquímicos, fisiológicos, histológicos o morfológicos* [12].

Los marcadores biológicos se pueden clasificar en tres tipos: de exposición, de efecto y de susceptibilidad. Los biomarcadores de exposición permiten detectar y cuantificar la presencia de una sustancia exógena dentro del organismo, detectando tanto los niveles del compuesto como de sus metabolitos o las alteraciones que produce en componentes endógenos, un ejemplo sería la detección de los niveles de plomo en el cabello. En cambio, un biomarcador de efecto indica alteraciones en el correcto funcionamiento de los procesos biológicos o bioquímicos que revelan modificaciones en las constantes fisiológicas, como pueden ser alteraciones en la actividad enzimática, cambios en los patrones de expresión del ADN o modificaciones en la composición celular de la sangre. Por último, un biomarcador de susceptibilidad se basa en la sensibilidad del individuo al efecto de un compuesto químico, determinado por sus factores genéticos que confieren diferente grado de sensibilidad a los individuos, por ejemplo diferencias en cuanto a la estructura o funcionalidad de los receptores [13].

Un buen biomarcador debe tener las siguientes características: relevante biológicamente, fácil muestreo y análisis fiable, específico para un tipo particular de exposición o mecanismo de acción, sensible para el reflejo de cambios no patológicos y reversibles, cuantificación reproducible y que su toma de muestras sea considerado éticamente aceptable [14].

Existen diferentes tipos de ensayos de toxicidad, como por ejemplo los ensayos de toxicidad aguda y de toxicidad crónica. En los primeros se utilizan dosis altas de la sustancia a analizar y tiempos de exposición cortos, permitiendo valorar la toxicidad del compuesto así como hacer estudios comparativos. Por el contrario, los ensayos de toxicidad crónica evalúan parámetros relacionados con el ciclo de vida, crecimiento y reproducción, como son la supervivencia, duración de los diferentes estadios, tamaño y peso de las larvas, eclosión de las puestas, emergencia de adultos, entre otros. Para ello se emplean dosis bajas del compuesto y tiempos largos de exposición.

En los estudios de toxicidad se emplean como modelos tanto cultivos celulares como organismos completos, en los cuales se puede estudiar cómo afectan estos compuestos en su comportamiento, fisiología e incluso a nivel molecular y celular. Entre los organismos que se emplean para el estudio de la contaminación en ecosistemas terrestres cabe destacar la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, el colémbolo *Folsomia candida*, el isópodo *Porcellio scaber* y el enquitreidos *Enchytraeus crypticus*. En el caso de ecosistemas acuáticos se emplean organismos pertenecientes a tres grupos taxonómicos diferentes: algas (*Scenedesmus acutus*), peces (*Danio rerio*) e invertebrados acuáticos (*Chironomus riparius*).

En nuestro laboratorio, perteneciente al Grupo de Biología y Toxicología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la UNED, se estudian los efectos a nivel molecular, bioquímico y celular que causan diferentes compuestos catalogados como potenciales disruptores endocrinos. Para analizar los posibles efectos que estas sustancias tienen sobre los sistemas biológicos se emplea como organismo de referencia larvas del mosquito *Chironomus riparius* (Meigen). Los *Chironomus* son utilizados en test de toxicología acuática y como indicadores de calidad de aguas basados en protocolos estandarizados para su empleo por parte de la USEPA [15], la ASTM (Sociedad Americana para el Ensayo de Materiales) [16] o la OCDE [17]. Las larvas de este mosquito viven asociadas a los sedimentos, donde se acumulan muchos contaminantes; además se encuentran en la base de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos, formando parte de la alimentación de muchas especies acuáticas y terrestres. Los compuestos químicos que se estudian se caracterizan por ser potenciales disruptores endocrinos, y haber sido detectada su presencia a niveles considerables tanto en el medio ambiente como en el ser humano.

La finalidad del grupo es identificar las vías y los mecanismos de acción de diferentes compuestos, probables disruptores endocrinos, en *C. riparius*. La identificación de dianas moleculares y rutas comunes de acción de los compuestos estudiados permite seleccionar biomarcadores que pueden ser utilizados en la monitorización de aguas. En el caso del mosquito *C. riparius* se han caracterizado diferentes genes que pueden ser empleados como biomarcadores [18, 19, 20]. Estos genes pertenecen a distintas rutas metabólicas del organismo, como son

las rutas endocrinas, de detoxificación y de estrés celular. Cuando se detectan alteraciones en los patrones de expresión de estos genes en el organismo, éstos pueden revelar que dicho organismo está o ha estado expuesto a una o varias sustancias químicas.

Aunque aún queda mucho camino por recorrer, gracias al desarrollo de nuevos estudios toxicológicos se está avanzando en el conocimiento y comprensión de cómo y a qué niveles afectan los diferentes agentes tóxicos.

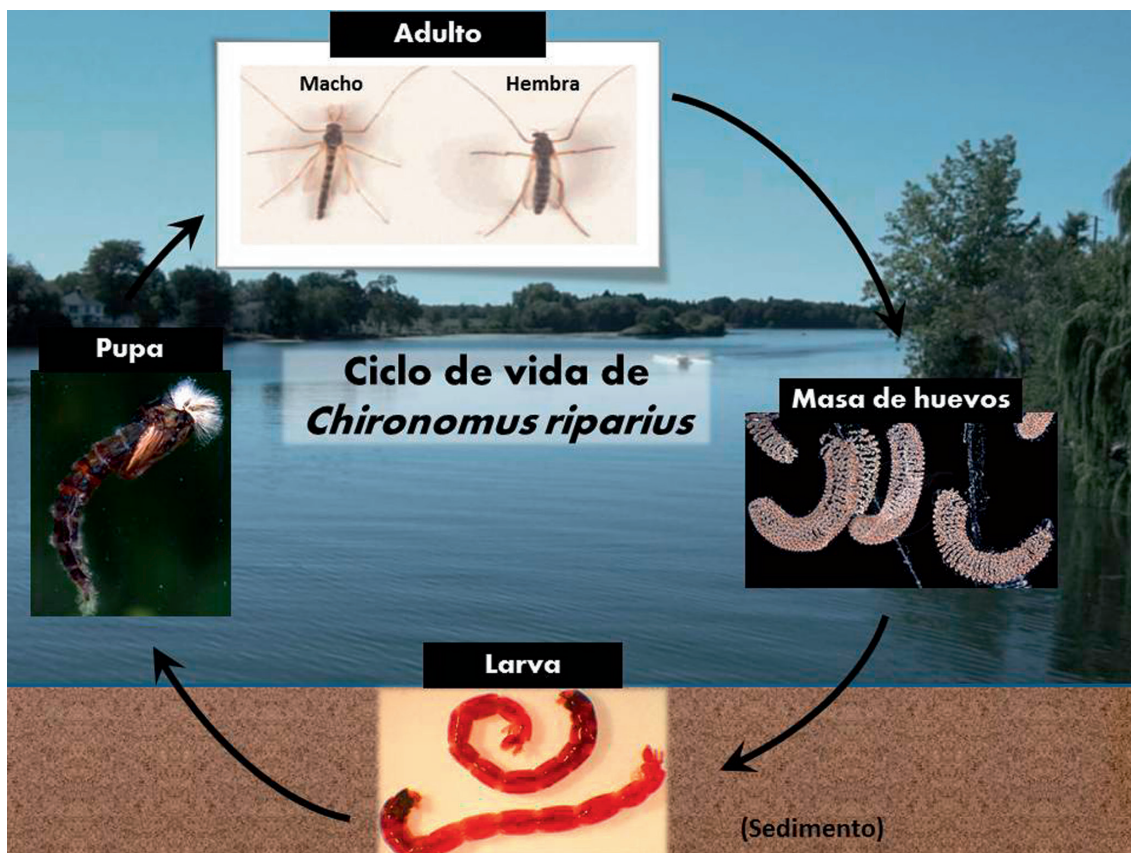


Figura 4. Ciclo vital del mosquito *Chironomus riparius*. Consta de las etapas de huevo, larva, pupa y adulto, siendo todas acuáticas excepto la última etapa. Comienza con la puesta de huevos en la superficie del agua, de los cuales eclosionarán las larvas, etapa asociada a los sedimentos.

ES TIEMPO DE ACTUAR

El avance en el conocimiento de los efectos de los xenobióticos es necesario para prevenir los problemas futuros que pueden causar su uso tanto sobre los seres humanos como sobre los ecosistemas. Estos compuestos no sólo son vertidos al medio ambiente, donde la mayoría se están acumulando, sino que nosotros también estamos sometidos a una constante exposición en nuestra vida diaria.

A raíz de observaciones en estudios de campo, experimentos con animales de laboratorio y estadísticas humanas y animales se empezaron a relacionar distintas alteraciones morfológicas o de comportamiento con un aumento en el uso de determinados compuestos y su liberación en los ecosistemas afectados, estos son los casos del insecticida DDT en EEUU o el anti-incrustante TBT en las costas de Francia. Debido a estas y otras evidencias, se prohibió el uso del DDT en 1972 en EEUU y del TBT en 2003 en la Unión Europea. Un ejemplo más

reciente es el del compuesto plastificante bisfenol A. Tras demostrar su capacidad de alterar el sistema endocrino en diferentes organismos, la Unión Europea prohibió su uso a partir del 1 de junio de 2011 en la producción de plásticos de los biberones de bebés [21].

Conscientes del problema a nivel mundial que supone la contaminación de las sustancias tóxicas diferentes organismos internacionales han desarrollado medidas de regulación mediante convenios y normativas para la protección de la salud humana y de los ecosistemas. El Consejo de Administración del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) aprobó el 7 de febrero de 1997 el inicio de actividades a nivel internacional para proteger la salud humana y el medio ambiente con medidas para reducir y eliminar las emisiones y descargas de contaminantes orgánicos persistentes (COPs), debido al riesgo que plantea a nivel mundial su potencial capacidad de desplazarse largas distancias. Tras varios años de negociaciones para llegar a compromisos legales por parte de los países signatarios se firmó el Convenio de Estocolmo el 22 de mayo de 2001, cuyo objetivo es la protección de la salud humana y del medio ambiente frente a los contaminantes orgánicos persistentes.

Además, promueve medidas para reducir o eliminar las liberaciones derivadas de la producción y utilización intencional y no intencional de COPs, así como la información, sensibilización y formación de la población y la investigación, desarrollo y vigilancia por parte de los países firmantes. En la actualidad se siguen incorporando nuevos compuestos a la lista del Convenio de Estocolmo, como es el caso del endosulfán, introducido en la lista de COPs en octubre de 2011 [22].

El 1 de junio de 2007 entró en vigor la normativa europea REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias Químicas) [23] para garantizar la protección de la salud humana y del medio ambiente mediante una mejor y más rápida evaluación de las propiedades de las sustancias químicas. Dicha normativa obliga al registro de todas las sustancias químicas que son importadas o fabricadas en la Unión Europea en cantidades superiores a una tonelada anual; además atribuye a los fabricantes, importadores y usuarios intermedios la responsabilidad de garantizar fabricación, comercialización o utilización de sustancias químicas que no afectan negativamente a la salud humana ni al medio ambiente. La entrada en vigor de la normativa REACH ha incrementado la información que existe de las sustancias químicas

y sus riesgos asociados, permitiendo que esta información se transmita a usuarios y consumidores.

Aunque se están tomando medidas a nivel nacional e internacional, aún sigue siendo necesaria una mayor sensibilización por parte de la sociedad y una estricta reglamentación de la producción y empleo de dichas sustancias por parte de los poderes públicos. El aumento en la investigación científica de estos compuestos ha llevado desde un mayor conocimiento de sus efectos en los seres vivos y la mejora de la forma de eliminación del medio hasta el rediseño de determinadas sustancias químicas para eliminar sus efectos nocivos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] OECD: OECD Environmental Outlook to 2030 (2008).
- [2] Toxic Substances List – ATSDR <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/index.asp>
- [3] Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakke-bæk, N.E.: *Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years*. British Medical Journal, **305**, 609-613 (1992).
- [4] Davis, D.L., Bradlow, H.L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D.G. & Anton-Culver, H.: *Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer*. Environmental Health Perspectives, **101**, 372-377 (1993).
- [5] Burlington, H. & Linderman, V.F.: *Effect of DTT on testes and secondary sex characters of white leghorn cockerels*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, **74**, 48-51 (1950).
- [6] Hill, M.K.: *Understanding environmental pollution*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.
- [7] Ruiz, J.M., Bachelet, G., Caumette P. & Donard O.F.: *Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France*. Environmental Pollution, **93**, 195-203 (1996).
- [8] Barreiro, R., Quintela, M., Ruiz, J.M.: *TBT e imposer en Galicia: los efectos de un disruptor endocrino en poblaciones de gasterópodos marinos*. Ecosistemas, XIII: sept-dic, 003 (2004).
- [9] Repetto, M. y Repetto-Jiménez, G.: *Toxicología fundamental*. Ediciones Díaz de Santos, 4ª edición, 2009.
- [10] Environment-Endocrine Disrupters Website (Annex 10) http://ec.europa.eu/environment/endocrine/strategy/substances_en.htm#priority_list

- [11] McCarthy J.F. & Shugart L.R.: *Biomarkers of environmental contamination*. Boca Raton, Lewis Publication, 1990.
- [12] Van Gestel C.A.M. & Van Brummelen T.C.: *Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms*. *Ecotoxicology*, 5, 217-225 (1996).
- [13] Committee on Biological Markers of the National Research Council: *Biological Markers in Environmental Health Research*. Environmental Health Perspectives, 74, 3-9 (1987).
- [14] Grandjean, P., Brown, S.S., Reavey, P. & Young, D.S.: *Biomarkers of Chemical Exposure: State of the Art*. *Clinical Chemistry*, 40, 1360-1368 (1994).
- [15] USEPA: *Methods of measuring the toxicity and bioaccumulation of sediments-associated contaminants with freshwater invertebrates*, 2nd ed. U.S Environmental Protection Agency. (Washington DC, USA). EPA-600/R-99/064 (2000).
- [16] ASTM: *Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. In: *Annual book of standards*. Vol 11.06. Philadelphia PA: ASTM. E1706-05 (2006).
- [17] OECD: *Guideline for testing of chemicals, sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment*. Organization for Economic Cooperation and Development. Test No. 218, 1-21 (2004).
- [18] Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L. & Morcillo, G.: *The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of Chironomus riparius*. *Chemosphere*, 71, 1870-1876 (2008).
- [19] Morales, M., Planelló, R., Martínez-Paz, P., Herrero, O., Cortés, E., Martínez-Guitarte, J.L. & Morcillo, G.: *Characterization of Hsp70 gene in Chironomus riparius: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153, 150-158 (2011).
- [20] Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L. & Morcillo G.: *Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in Chironomus riparius aquatic larvae*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 155, 333-343 (2012).
- [21] Directiva 2011/8/UE de la Comisión (28 de enero de 2011).
- [22] Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. Programa de las Naciones Unidas para el medio ambiente (PNUMA).
- [23] Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo (18 de diciembre de 2006).

Pedro José Martínez de Paz e Irene Ozáez Martínez
 Grupo de Biología
 Dpto. de Física Matemática y de Fluidos