

CAPÍTULO 4

Bases sobre los efectos tóxicos inducidos por los contaminantes

Pedro Carriquiriborde

En los capítulos previos, se ha explicado como los contaminantes que ingresaron al ambiente y se distribuyeron en los diferentes compartimientos ambientales pueden estar más o menos biodisponibles para ingresar a los organismos, distribuirse por el/los sistema/s circulatorio/s, disponerse en los diferentes tejidos, biotransformarse, eliminarse y eventualmente acumularse respecto a las concentraciones externas. En el presente capítulo analizaremos como esos contaminantes almacenados en los tejidos pueden interactuar con las biomoléculas generando efectos tóxicos sobre los organismos que se manifiestan a diferentes niveles de organización y en función de la concentración y tiempo de exposición. En tal sentido, primero se describirán los mecanismos de acción de los contaminantes para luego abordar los efectos adversos que se pueden manifestar a nivel molecular, bioquímico, histológico, fisiológico y como ello puede afectar aspectos fundamentales para la viabilidad de las poblaciones como es la supervivencia. En capítulos subsiguientes se abordarán los efectos subletales que afectan el desempeño biológico de los organismos (desarrollo, crecimiento, comportamiento y reproducción).

Mecanismo y modos de acción de los contaminantes

Desde que un contaminante ingresa al organismo interactuará con las diferentes biomoléculas (lípidos, hidratos de carbono, proteínas o ácidos nucleicos) que constituyen las células y matriz extracelular de los tejidos. De acuerdo a su naturaleza, cada contaminante tendrá una afinidad diferencial por cada uno de estos componentes e interactuará con los mismos de una forma dada. Sin embargo, la acción tóxica del contaminante se desplegará sólo cuando alcance una concentración interna en el sitio blanco capaz de disrumpir la fisiología normal de las biomoléculas con las que interacciona. En tal sentido, importante diferenciar entre el concepto de mecanismo de acción y el de modo de acción. El **mecanismo de acción** de un contaminante está dado por proceso bioquímico de interacción xenobiótico-biomolécula, mientras que el **modo de acción** es la manifestación fisiológica y comportamental que caracteriza la respuesta adversa inducida específicamente por dicha interacción.

Las principales biomoléculas con las que interactúan los contaminantes son los lípidos de las membranas plasmáticas, las proteínas y el ADN, sin descartar las que puedan ocurrir con los hidratos de carbono y el ARN. Tres mecanismos de acción básicos (Figura 4.1.) pueden identificarse de acuerdo a las tres siguientes interacciones tóxico-biomolécula: i) las de **partición** del contaminante en las membranas biológicas son relativamente inespecíficas, reversibles y están estabilizadas principalmente por fuerzas de van der Waals; ii) las **estéricas** también estabilizadas por uniones débiles y reversibles entre aceptores y donadores de protones y/o fuerzas de van der Waals, pero donde resulta particularmente importante en el reconocimiento específico de receptores moleculares y la inhibición competitiva de los sitios activos de las enzimas y iii) la **reactiva** implica la formación de una unión fuerte no reversible, enlace covalente, entre un contaminante electrofílico (aldehído, epóxido, hidrocarburo alifático insaturado clorado) y un grupo nucleofílico de la biomolécula. Si bien los efectos adversos asociados a estas interacciones pueden ser revertidos por sistemas de defensa o desactivación metabólica, tales interacciones son el primer paso de la cascada de eventos que finalmente conduce a un efecto tóxico apreciable.

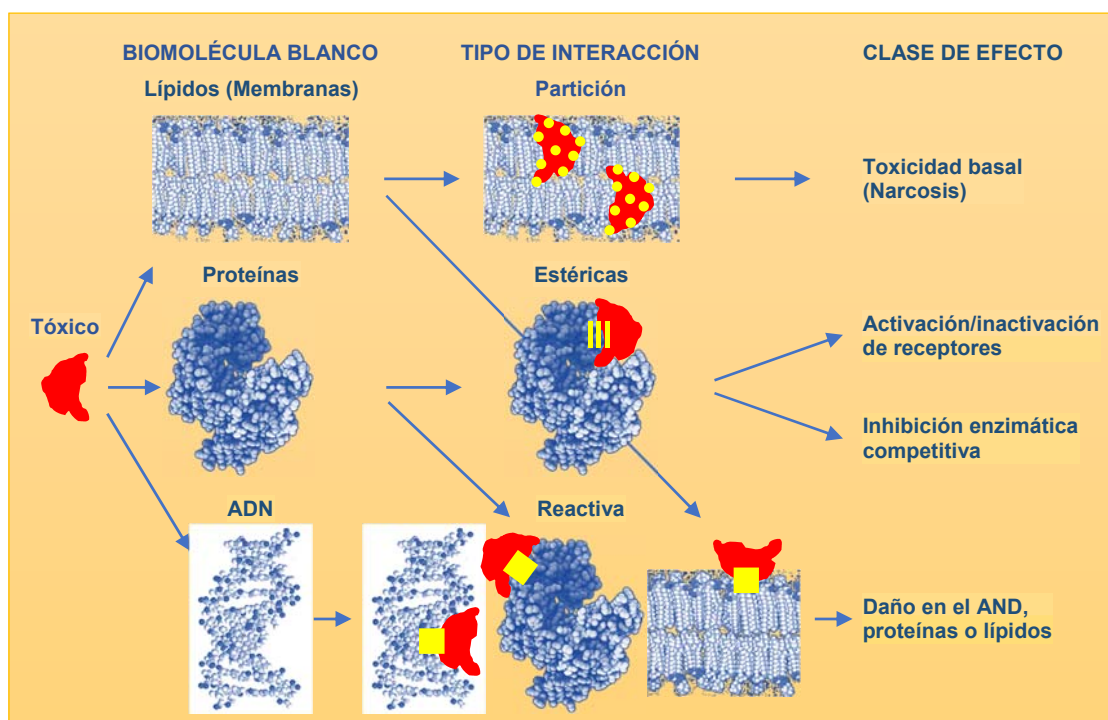


Figura 4.1: Mecanismo de acción de los contaminantes según el tipo de interacción con las biomoléculas blanco.

La vinculación de cada una de las tres interacciones con sitios blanco específicos (ej. membrana mitocondrial) ha permitido la clasificación de 10 grupos modos de acción diferentes (Tabla 4.1.). Uno de los modos de acción es la denominada **toxicidad basal o narcosis** que se refiere a la interacción inespecífica mediante fuerzas de van der Waals de sustancias lipofílicas con las membranas biológicas alterando su integridad y disrumpiendo así su fisiología normal. Esta interacción representa la toxicidad mínima de una sustancia determinada, es reversible y dada la inespecificidad las concentraciones efectivas de diferentes tóxicos es muy similar. Además, la exposición sucesiva a dosis subletales no modifica la sensibilidad del organismo.

Tabla 4.1: Relación entre sitio blanco, mecanismos y modos de acción de los contaminantes a nivel celular.

Biomolécula blanco	Subclase	Dominio	Interacción	Mecanismo molecular	Modo de acción	Test
Membrana biológica	General	M	NS	Disrupción no específica de la estructura y función	Toxicidad basal	Prueba de rojo neutro Kinspec
	General	M	S	Inducción de intermediarios reactivos (Ej. ROS) causando peroxidación lipídica y de proteínas.	Degradación de lípidos y proteínas	TBARs
	Trasducción de energía	M	N, NS	Mecanismo transportador de electrones	desacoplante	Consumo de O ₂ en mitocondria, Kinspec
		M	S	Bloqueo de quinonas y otros sitios de unión	Inhibición del transporte de electrones	
		M	S	Bloqueo de canales de protones	Inhibición de la ATP sintetasa	
Proteínas/péptidos	Fotosíntesis	M	S	Bloqueo del transporte de electrones	Inhibición de la fotosíntesis	
	General	M, C	NS, S	Reacciones electrofílicas y alquilación	Daño de proteínas y péptidos	Reducción de los niveles de GSH
	Receptores y enzimas	M, C	S	Unión no covalente a receptores y enzimas	Inhibición o competencia	Actividad enzimática Receptor de estrógenos Inducción de CYP1A1
	Receptores y enzimas	C	S	Unión no covalente a receptores y enzimas del metabolismo del ADN (replicación, reparación)	Mutagenicidad indirecta	Prueba SOS Prueba de Ames
ADN, ARN	General	C	NS, S	Ataque electrofílico y alquilación de bases nitrogenadas	Mutagenicidad directa	Aductos de ADN Inducción de mecanismo de reparación

M: membrana biológica, C: citoplasma, NS: inespecífico, S específico (adaptada de Escher et al., 2002)

Como se ha mencionado en el capítulo previo, para sustancias con un $\log K_{ow} > 2$, puede establecerse una relación, en el equilibrio, entre la concentración efectiva interna a nivel de la concentración en el cuerpo (ej. ILC_{50}) y la concentración en el medio (ej. LC_{50}) a través de la ecuación:

$$ILC_{50} = K_b \times LC_{50}$$

Los valores de ILC_{50} para toxicidad basal oscilan entre los 2 y los 8 mmol/Kg (peso del cuerpo) o entre 30 y 60 mmol/Kg de lípidos si se lo normaliza por el contenido lipídico. Estos valores disminuyen entre 0,6 y 2 mmol/Kg cuando se trata de sustancias más polares, efecto generalmente referido como narcosis polar. Sin embargo, esta diferencia no sería debida a diferencias en la concentración en la membrana sino por estimación del ILC por la concentración corporal que pondría de manifiesto la existencia de una distribución diferencial entre compartimientos blanco (membranas) y no blanco (ej. tejido adiposo) para sustancias apolares y polares. La IEC también ha sido útil para definir riesgo asociado a efectos subletales. En cuanto a la variabilidad en la sensibilidad entre especies frente a contaminantes con toxicidad basal se ha observado que, si bien pueden variar entre 5 órdenes de magnitud, suelen ser menores que las de contaminantes con mecanismos de acción específicos.

Los demás modos de acción están dados por interacción específicas estéricas y reactivas que generalmente suelen ser más tóxicas que la narcosis y su predicción a través de la concentración del residuo del contaminante en el organismo no es tan precisa dado que la misma no depende sólo de la concentración sino también de la actividad específica que posea el tóxico. Por tanto, los IEC no sólo son menores, sino que también varían más entre sustancia y sustancia según su modo de acción. Las diferencias en la potencia para este tipo de tóxicos, no sólo es mucho más variable entre compuestos por sus diferentes modos de acción, sino que también en cuanto a la sensibilidad entre especies para cada uno de ellos dado que, por ejemplo, un inhibidor de la fotosíntesis afectará más a los vegetales que a los animales. En cuanto a la relación entre el tiempo y la toxicidad, se observa que para aquellos tóxicos cuya interacción es irreversible se comportan siguiendo la ley de Harber (desarrollada originalmente para gases reactivos) que sostiene que el producto de la concentración y el tiempo de exposición es constante para una respuesta dada. Para este tipo de sustancias la toxicidad de las mezclas dependerá si el sitio blanco y el modo de acción es el mismo. Si es así, el modelo de adición es el que mejor se ajusta. De lo contrario, podrían actuar de forma sinérgica o antagónica en el caso que los componentes interactuaran unos con otros o actuaran sobre blancos que se encuentran relacionados como, por ejemplo, si uno inhibe la enzima de biotransformación del otro. Este es el caso típico del butóxido de piperonilo que es una sustancia que posee una toxicidad muy baja, pero que es un potente inhibidor del Citocromo P450, sistema que biotransforma a los insecticidas piretroides, y que por tanto en una mezcla potencia la acción de estos insecticidas.

Desde ya, existen tóxicos que pueden desencadenar diferentes modos de acción dependiendo de las características de su molécula y la concentración en diferentes sitios blanco. Por

ejemplo, los clorocatecoles pueden actuar como narcóticos a altas concentraciones durante exposiciones agudas, pero generar daños por estrés oxidativo a concentraciones más bajas y exposiciones crónicas, en presencia de Cu.

Manifestación de los efectos tóxicos de los contaminantes a nivel de los organismos

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, el objetivo de la ecotoxicología es comprender como los contaminantes afectan la estructura y función de los ecosistemas. Sin embargo, la acción directa de los contaminantes se ejerce sobre los organismos actuando a través de los mecanismos y modos de acción enumerados en la sección previa. Ello conducirá luego a efectos adversos que pueden impactar sobre variables fundamentales para el desempeño biológico de una especie y que aseguran el sostenimiento de la población y la interrelación con otras especies y con los factores abióticos del ecosistema. El mantenimiento de una población depende fundamentalmente de que los individuos puedan crecer, sobrevivir y reproducirse adecuadamente. Por lo tanto, cualquier efecto de un contaminante que afecte estas variables tendrá relevancia ecológica.

Las respuestas de los individuos a los contaminantes pueden manifestarse a diferentes niveles desde el nivel molecular, celular, histológico, fisiológico y ello finamente podrá traducirse como un efecto adverso sobre el crecimiento, la reproducción y la supervivencia. Los modos de acción a **nivel molecular**, ya enumerados, son el primer nivel de interacción directa del contaminante con el sistema biológico que, como ya se dijera, puede afectar la expresión de genes, la actividad enzimática o el funcionamiento de cualquier otro sistema subcelular (ej. membranas). Tales interacciones a nivel molecular tendrán como consecuencias respuestas a **nivel celular**, afectando la fisiología normal de las células (ej. alteración de la transmisión del impulso nervioso causada por varios insecticidas organoclorados y piretroides, alteración de la fotosíntesis por herbicidas como la atrazina), haciendo que se desregule el ciclo celular e induciendo la proliferación celular (ej. carcinógenos) o induciendo una muerte celular programada o no programada, entre muchas otras. Ello podrá generar cambios a **nivel histológico** que serán evidenciados como alteraciones histopatológicas tales como, por ejemplo, la aparición de adenomas o carcinomas en diferentes tejidos, la desmielinización del tejido nervioso, apoptosis y/o necrosis en el hígado (ej. cirrosis) u otros tejidos o afectando la proporción célula/matriz y/o de distintos tipos celulares (ej. aumento de células del cloro en las branquias, intersexos en las gónadas). En algunos casos, puede que los efectos no se manifiesten a nivel histológico, pero de alguna forma siempre se manifestará un efecto a **nivel fisiológico**, afectando el funcionamiento de los órganos y sistemas (ej. neurotoxicidad inducida por insecticidas, nefrotoxicidad causada por sustancias como el Cd o hepatotoxicidad o como el caso del alcohol, etc.)

Afortunadamente, frente a los insultos propinados por los contaminantes, los sistemas biológicos son capaces de contraponer, a diferentes niveles, mecanismos de reparación o compensación que les permite, dentro de cierto rango, contrarrestar el efecto tóxico del contaminante.

Por ejemplo, a nivel molecular, las células son capaces de activar sistemas de defensa tales como las enzimas del sistema antioxidante, de biotransformación o reparación del ADN. También respuestas a nivel fisiológico pueden reducir el efecto tóxico de los contaminantes como, por ejemplo, aumentando el ritmo cardíaco y la ventilación pulmonar para aumentar la eliminación de sustancias volátiles, aumentando la infiltración de células sanguíneas en los tejidos, o incrementando la secreción mucosa en la epidermis para evitar el contacto de sustancias agresivos para los epitelios.

En consecuencia, la manifestación o no de efectos adversos y el nivel de gravedad de los mismos dependerá en gran medida del balance entre la magnitud del daño infringido por el contaminante, que dependerá de la **intensidad de la exposición** (concentración y tiempo), y la capacidad de reparación/compensación que posea el sistema biológico (Figura 4.2). La forma que adopte tal relación dependerá tanto de las propiedades fisicoquímicas del contaminante como de las características biológicas del organismo. Por debajo de ciertas concentraciones, el contaminante puede que no genere ningún efecto adverso o inclusive induzca una respuesta beneficiosa (hormesis), siendo así el estado del organismo saludable. Al incrementarse la concentración puede que el contaminante cause un daño pero que el mismo pueda ser reparado o compensado y ello requiera de la activación de mecanismos que generan estrés en el individuo. Si la intensidad de la exposición es aún mayor, puede que esos mecanismos de reparación se vean sobrepasados y no puedan ser compensados, por lo tanto, el organismo comenzara a manifestar síntomas patológicos. Dependiendo del grado de daño, los efectos podrán ser curables, si el daño es reversible o incurables, si el daño ya es irreversible y si la exposición no cesa, el organismo finalmente morirá.

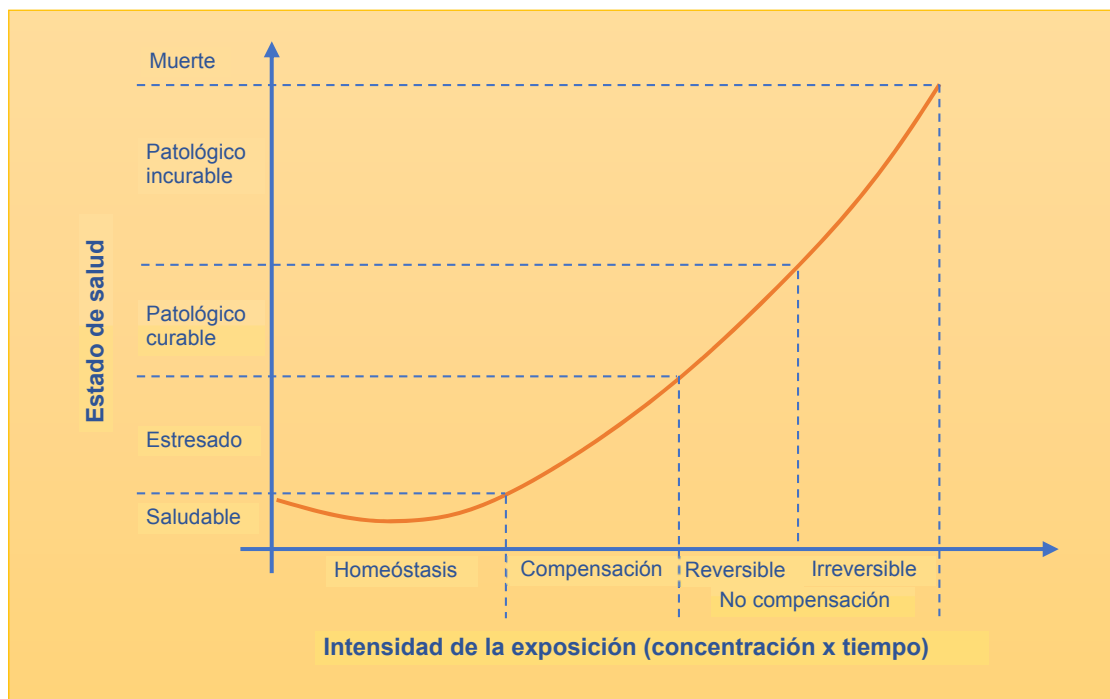


Figura 4.2: Relación entre la intensidad de exposición a un contaminante y el estado de salud de un organismo.

Es importante destacar que, además de los modos de acción específicos que se mencionaron anteriormente, los contaminantes pueden considerarse agentes que inducen estrés. En tal contexto, se define como **estrés** (o estrés Selyano) a un conjunto de respuestas inespecíficas (dado que responden de igual modo a diferentes agentes de estrés) pero bien definidas del cuerpo dirigidas a reestablecer o mantener la homeóstasis frente a la acción de un agente estresor que induce una demanda extraordinaria en el cuerpo. A dicho conjunto de respuestas se lo conoce como **Síndrome General de Adaptación** (GAS) y posee tres **fases**: i) la primera, es la de **alarma** y consiste en el aumento de la presión sanguínea, frecuencia respiratoria, el ritmo cardíaco y los niveles de cortisol, catecolaminas (epinefrina y norepinefrina), endorfinas y glucosa en sangre regulados tanto por el sistema nervioso simpático como por el eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (HHA), ii) en la segunda fase, de **adaptación**, se observa una hipertrófica de dicho órgano y la hipotrofia de otros como el timo o el bazo, la aparición de úlceras, cansancio, falta de apetito y la pérdida de peso y iii) en la tercera fase, de **agotamiento**, el organismo falla en su capacidad adaptarse y si la exposición continúa terminará muriendo.

Entre las manifestaciones del efecto inducido por los contaminantes los más relevantes desde el punto de vista ecotoxicológico son aquellos que afecten de forma directa o indirecta la supervivencia y la reproducción de los organismos ya que son las dos variables más importantes desde el punto de vista del mantenimiento de la viabilidad de las poblaciones. El efecto sobre la **supervivencia** puede ser directo dado que el propio tóxico conduce a la muerte de los organismos por los mecanismos señalados en el párrafo anterior o indirecta si causan por ejemplo efectos sobre el desarrollo (ej. agentes teratogénicos como al Pb, benzo[a]pireno o los PCB's), el crecimiento (integra un conjunto de respuestas fisiológicas y bioquímicas que reflejan la aptitud individual), el comportamiento (incapacidad de alimentarse o mayor vulnerabilidad a la predación) o la susceptibilidad a contraer enfermedades endógenas o exógenas (causadas por agentes patógenos) que finalmente terminen por reducir la capacidad de supervivencia. Por otro lado, la **reproducción** también puede ser afectada de forma directa (ej. la alteración de las gónadas y la producción o liberación de gametas) o de forma indirecta a través de alteraciones en el comportamiento reproductivo.

La relación dosis(concentración)-respuesta y tiempo-respuesta: indicador de la relación causa-efecto.

Si bien el término concentración posee mayor relevancia en la ecotoxicología, dado el uso difundido de la expresión curva dosis-respuesta (CDR) heredado de la toxicología, en este capítulo se utilizará el término dosis y concentración de forma indistinta de modo de simplificar la lectura. La existencia de una relación entre la dosis de una sustancia y su toxicidad es un concepto central de la toxicología. El padre de la toxicología moderna, Theophrastus Phi-

Ilippus Aureolus Bombastus von Hohenheim-Paraelsus (1493–1541), identificó tempranamente dicha relación indicando “*Sola dosis facit venenum*” (sólo la dosis hace al veneno) y estableció la dependencia dosis-respuesta como un baluarte de la toxicología. Cualquiera sea la respuesta seleccionada o medida, la relación entre el grado de respuesta del sistema biológico y la cantidad de tóxico administrado asume una dependencia tan consistente que se considera el concepto más fundamental y dominante en toxicología. Ello quiere decir que existe una relación entre el nivel de exposición, dada por la concentración o el tiempo, la cantidad de la sustancia que alcanza su el sitio blanco y el efecto biológico que desencadena. Al utilizar las curvas dosis respuesta se asumen tres principios básicos: 1) la respuesta observada en el organismo es debida a la sustancia a la que ha sido expuesto, 2) la magnitud de la respuesta está vinculada con la dosis y 3) existen tanto un método para cuantificar el tóxico y como una manera precisa de expresar la toxicidad.

El establecimiento de la función que describe dicha relación es fundamental para poder modelizarla y por tanto poder comprender y predecir el comportamiento de la respuesta incluso a concentraciones o tiempos que no se han ensayado experimentalmente. En toxicología suelen diferenciarse los términos de dosis efectiva, dosis tóxica y dosis letal, refiriéndose en el primer caso a la dosis de una sustancia que produce un efecto deseado, tóxico o letal, respectivamente. En ecotoxicología, el término **concentración efectiva** (EC_x) suele utilizarse de forma genérica, luego especificándose el tipo y magnitud del efecto. Por ejemplo, si se trata de la concentración que inhibe el 50% de la actividad de una enzima se denominará concentración inhibitoria 50 (IC_{50}), si se trata de la concentración que produce una mortalidad de 50% se hablará de la **concentración letal 50** (LC_{50}) mientras que si se trata de la concentración que produce un 25% de mortalidad se referirá a la concentración letal 25 (LC_{25}). Gracias a la construcción de la CDR a través de un modelo matemático, es posible estimar la concentración efectiva para cualquier nivel de efecto.

De un modo diferente, la concentración más alta que no produce efecto (**NOEC**) o la más baja que produce efecto (**LOEC**) respecto al grupo control suelen estimarse a partir de concentraciones ensayadas, por lo cual, cuán lejos estén una de la otra dependen del diseño experimental y existirán en teoría infinitas concentraciones entre una y la otra. Los valores de NOEC y LOEC se estiman a partir de las diferencias obtenidas a partir de un test de hipótesis realizado mediante alguna prueba estadística paramétrica (ej. análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test a posteriori como el Dunnett) o no paramétrica (ej. Kruskal-Wallis). En algunos trabajos se han estimado el NOEC y el LOEC a partir de la EC_{10} y la EC_{25} , respectivamente. Dadas las limitaciones mencionadas para obtener el NOEC y el LOEC, estos valores están siendo substituidos con fines regulatorios dado que es más robusto trabajar con la función de toxicidad que con estos valores aislados.

De acuerdo al tipo de respuesta, pueden distinguirse dos tipos principales de relaciones dosis-respuesta. Por un lado, una de tipo **gradual**, en la cual la variable biológica que se analiza es continua en relación a la concentración de exposición. Ejemplo de ello sería la inhibición de la

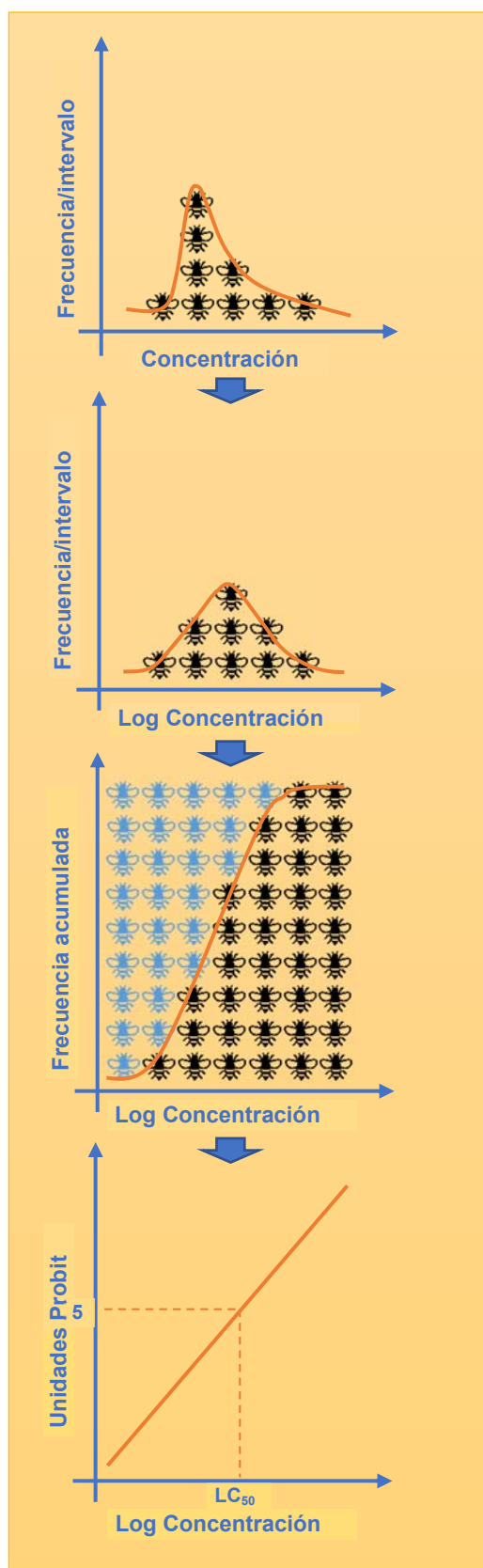


Figura 4.3: Curva dosis-respuesta de tipo cuantal para respuestas todo/nada como la mortalidad y su linealización a través de la transformación a unidades Probit

enzima AchE en el cerebro al aumentar la concentración de exposición a un pesticida organofosforado. Por otro lado, una de tipo **cuantal**, cuando la variable biológica es discreta, esto quiere decir que posee una respuesta de tipo todo o nada, para una concentración dada se observa o no el efecto en un individuo y, en la curva, la variable respuesta es la proporción de individuos que respondieron respecto al total de la población. El caso más característico es la mortalidad. En una población expuesta a una cantidad dada de un tóxico y tiempo determinados, un organismo estará vivo o muerto.

En el caso particular de la CDR cuantal, la misma se ha basado inicialmente en el concepto de **dosis efectiva individual (EID)** o **tolerancia individual**. Dicho concepto sostiene que para cada individuo de una población existe una dosis mínima capaz de causar su muerte y que es característica de cada individuo. Esto quiere decir que en una población dada existen individuos más sensibles y otros más tolerantes y que si se los expone en repetidas ocasiones al mismo tóxico, cada uno siempre responderá de la misma forma, siendo que los primeros responderán a concentraciones más bajas que los segundos. De acuerdo a este concepto, la frecuencia de la respuesta en la población se comporta siguiendo una distribución sesgada a la izquierda que se normaliza (adquiere la forma simétrica de la distribución normal) al expresarla en función del logaritmo de la concentración (tipo log normal), que a su vez puede expresarse como frecuencia acumulada y finalmente convertida a unidades Probit de forma tal de linealizar la función (Figura 4.3.). Las unidades Probit se obtienen de la transformación del porcentaje de respuesta a un metámero construido a partir de obtener el valor de z ingresando con el porcentaje de mortalidad acumulado en la tabla de distribución normal equivalente (NED), de valor promedio igual a 0 y el desvío

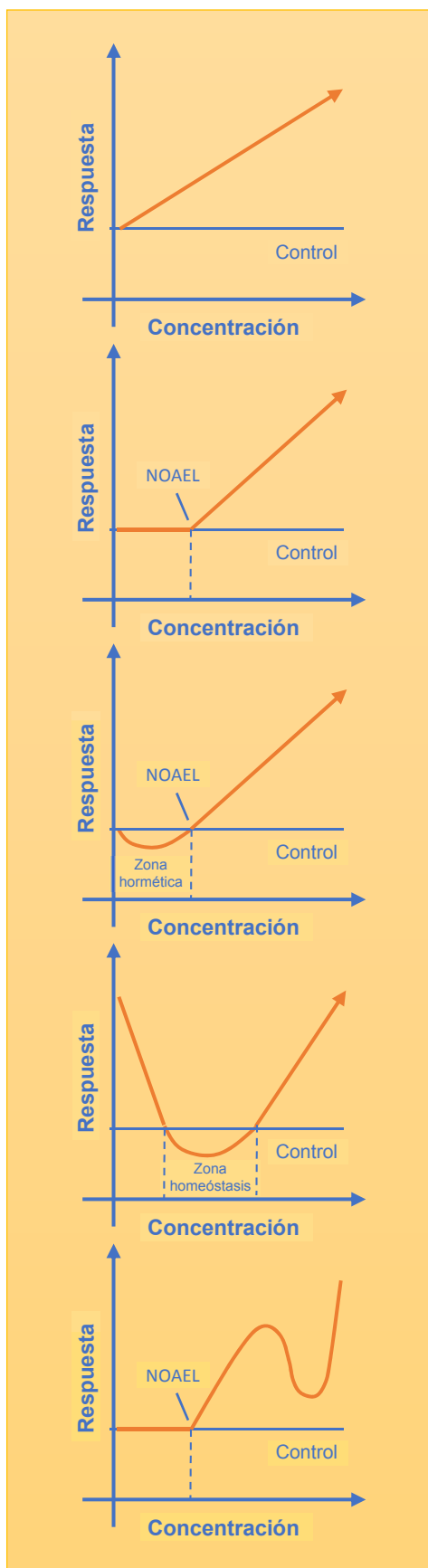


Figura 4.4: Modelos de curvas dosis-respuesta (CDRs)

estándar de 1, y sumándole 5, para evitar los valores negativos. Por consiguiente, una mortalidad del 50% coincidirá con un valor de z de 0 y por tanto equivaldrá a 5 unidades Probit, una mortalidad del 16% y 84% con un valor de -1 y 1 para z y de 4 y 6 unidades Probit. Otros métodos como el Spearman-Kärber, el de la media móvil o incluso el método semigráfico de Litchfield-Wilcoxon pueden ser utilizados para estimar la LC_{50} .

El concepto de tolerancia individual ha sido contrastado con la posibilidad que la respuesta de los organismos en una población expuestos a un tóxico sea estocástica, ello quiere decir que quienes responden a concentraciones más bajas o más altas es una cuestión de azar y que si se repitiera la exposición no siempre los más sensibles o más tolerantes serían los mismos individuos, sino que ello variará entre exposiciones de modo azaroso. Esto ha llevado utilización de diferentes modelos como el log-normal, el log logístico y el Weibull entre otros, para su descripción.

Dado que experimentalmente se han obtenido evidencias que apoyan tanto el modelo de tolerancia individual como el estocástico, más recientemente se ha propuesto el **Modelo de Supervivencia de Umbral Unificado** (GUTS). El mismo establece una relación matemática entre los dos modelos previamente mencionados, según el cual, la respuesta estocástica daría lugar a mecanismos de daño/repación sistemáticamente más rápidos que la tolerancia individual por lo cual el mecanismo de respuesta estaría inherentemente vinculado a la velocidad de recuperación del daño.

Si bien el tipo de relación entre la concentración y la respuesta, especialmente tratándose de efectos letales, más frecuentemente se visualiza como **curvas monótonicas** y generalmente de forma sigmoidea, las relaciones entre la concentración y la respuesta tóxica pueden ser interpretadas por diferentes funciones, en particular para efectos subletales, siendo tres los modelos más utilizados, el

lineal, el umbral y el hormético (Figura 4.4.). En el **lineal** se asume que no existe una concentración segura y es el modelo utilizado para describir la relación dosis-respuesta de sustancias carcinogénicas. El modelo **umbral**, se asume que existe una concentración límite por debajo de la cual no existen efectos adversos. A tal concentración se la denomina “nivel de no efecto observado” (**NOAEL**), que en otras palabras puede definirse como la mayor concentración de la sustancia que no produce un efecto adverso. También es importante considerar que algunas sustancias pueden presentar respuestas **no-monotónicas** como las representadas en el modelo **hormético**. Este modelo está vinculado al concepto de **hormesis**, el cual considera que por debajo del NOAEL la sustancia posee un efecto benéfico para la salud de los organismos. La zona hormética puede extenderse hasta 10 veces por debajo de la concentración del NOAEL y generar una respuesta de estimulación de hasta 160% respecto al control. Aquellas sustancias que son elementos esenciales (ej. Cu, Fe) pueden tener efectos adversos tanto a concentraciones mayores al NOAEL por efecto tóxico, como a concentraciones muy bajas por efecto de la deficiencia. En tal caso se dice que la **respuesta en forma de “U”**. Es importante resaltar que la respuesta monotónica puede ser directa o inversamente proporcional a la dosis, dependiendo como se exprese la respuesta biológica. Por ejemplo, la relación será directa si la expresamos en término de la mortalidad, pero indirecta si lo hacemos en términos de la supervivencia. Lo mismo ocurrirá con la actividad de una enzima que es inhibida por un contaminante, si se expresa en términos de la actividad absoluta, la relación será inversa, mientras que si se la expresa en términos del % de inhibición será directa. Otro tipo de respuestas no monotónicas son las comúnmente desencadenado por los disruptores endocrinos (ej. Bisfenol-A) que a concentraciones bajas pueden inducir la expresión de determinados receptores, pero inhibiéndolos a concentraciones altas.

Las CDR, además de describir la función de toxicidad de cada sustancia, permiten comparar la potencia y eficacia de diferentes sustancias (Figura 4.5.). La **potencia** puede ser definida como el intervalo de concentración de una sustancia que produce una respuesta creciente y que en la práctica puede obtenerse a partir de la dosis efectiva (concentración que produce un efecto dado). Por otra parte, la eficacia máxima, o simplemente **eficacia**, es el valor máximo de una respuesta dada que puede inducir una sustancia y está dada por el valor máximo de dicha respuesta. Otra información útil que puede obtenerse de las CDR para la comparación entre tóxicos es la **pendiente** de la curva, la misma informa sobre cuán abrupta es la respuesta en función del cambio de concentración. Los efectos tóxicos producidos por algunos contaminantes se van incrementando de manera paulatina a lo largo de un intervalo amplio de concentraciones y poseen una CDR más aplanada, mientras que para otros una pequeña diferencia en la concentración produce un cambio brusco en la respuesta, mostrando una CDR más empinada.

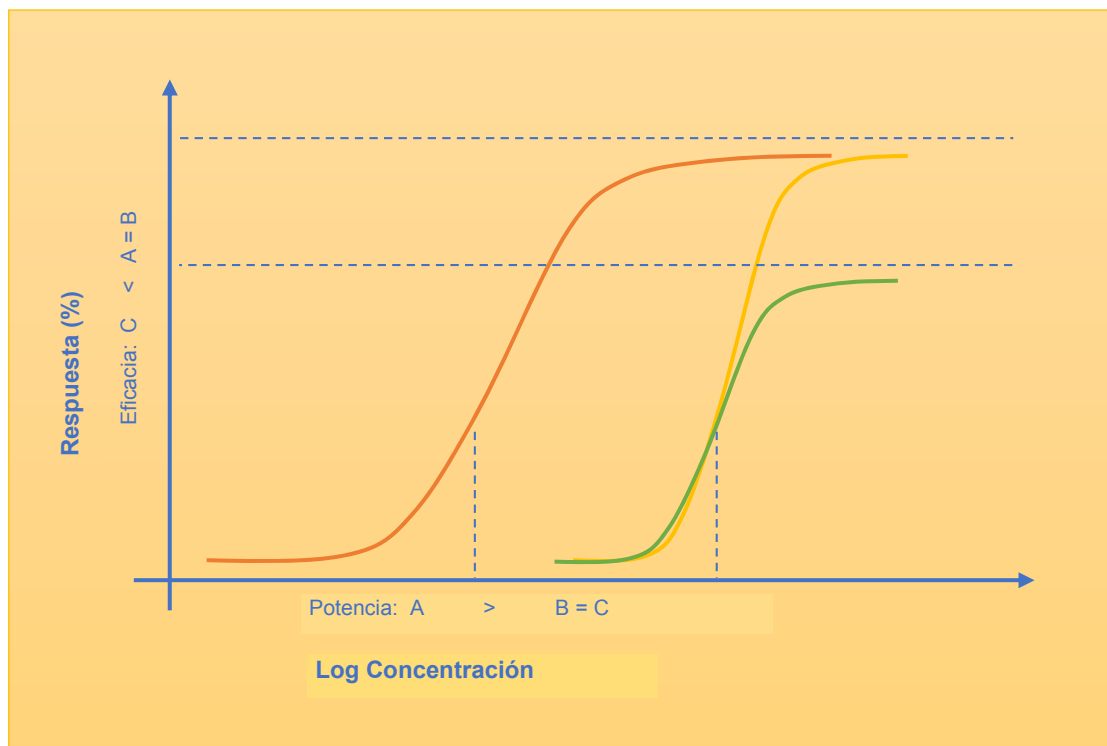


Figura 4.5: Relación entre potencia y eficacia de diferentes sustancias

Como se ha mencionado previamente en una población existen **diferencias entre individuos** en la respuesta a una sustancia debido, por ejemplo, a la existencia de pequeñas diferencias genéticas (polimorfismos) entre ellos. Así también existen **diferencias entre especies** que generalmente son más marcadas y pueden no ser sólo cuantitativas, sino también cualitativas. Tales diferencias deben ser consideradas si se extrapolan resultados obtenidos a partir de una especie a otra. El concepto de **toxicidad selectiva** se refiere justamente al efecto tóxico que puede tener una sustancia sobre una especie dada y no sobre otra y que pueden tanto radicar en procesos de absorción, biotransformación, excreción o la presencia o ausencia del sitio blanco en una de las especies, como podrían ser enzimas de una vía metabólica exclusiva de un grupo. Esta diversidad ha sido aprovechada para el desarrollo de agentes que son letales para una especie no deseada y no para otras. Por ejemplo, un herbicida afectará una vía metabólica exclusiva de los vegetales (ej. fotosíntesis) sin afectar a los animales.

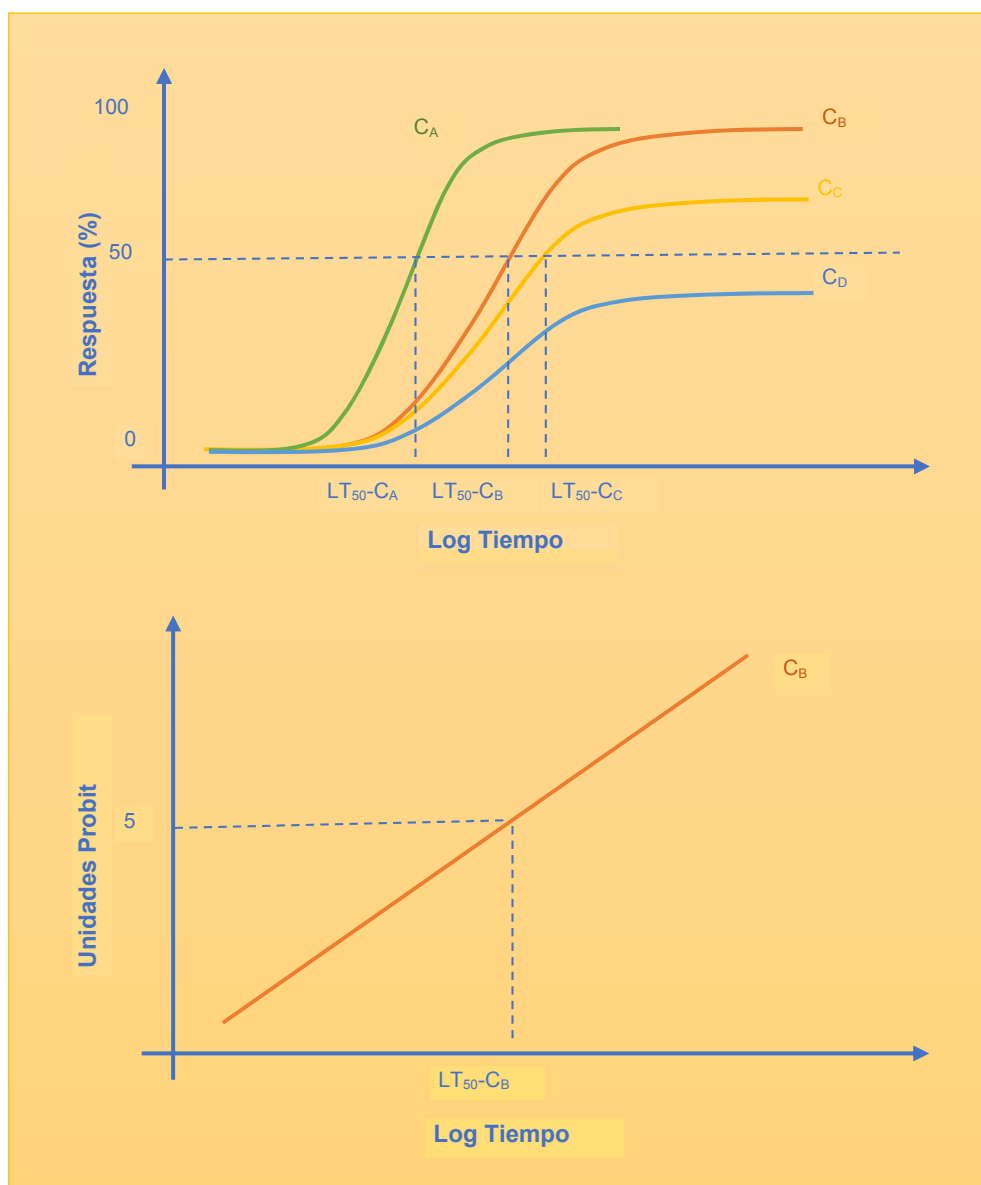


Figura 4.6: Curvas tiempo-respuesta (CTR)

El efecto tóxico de una sustancia, no sólo depende de la concentración sino también del tiempo de duración de la exposición. En tal sentido es importante conocer la **relación tiempo-respuesta**. Poder determinar del tiempo que demorará en manifestarse un determinado efecto bajo a un determinado nivel de exposición es extremadamente útil en ecotoxicología. Dicho tiempo dependerá de la toxicocinética de la sustancia que determinará la velocidad y el grado con que una sustancia se acumula en los tejidos blanco hasta alcanzar la EIC (concentración interna efectiva). Por consiguiente, del mismo modo que es posible elaborar las CDR es posible construir curvas tiempo-respuesta (CTR) (Figura 4.6.). Para ello se grafican los diferentes niveles de efecto en función del tiempo. Este tipo de análisis presenta ventajas desde el punto de vista del diseño experimental ya que comparativamente provee mayor información por unidad experimental que las CDR. Pese a ello es aún subutilizado en ecotoxicología.

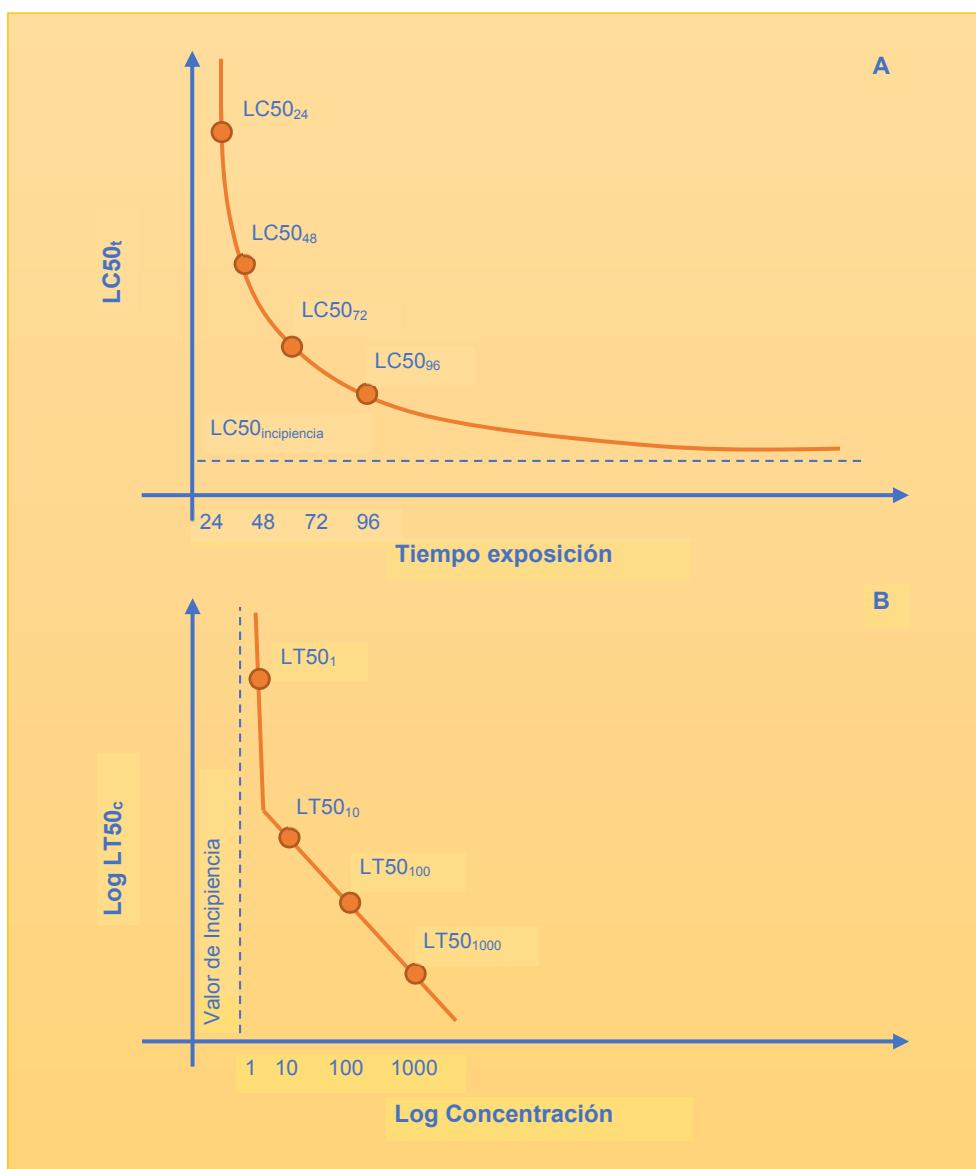


Figura 4.7: Valores de incipencia obtenidos a partir de las LC_{50_t} o los LT_{50_c} .

Uno de los usos de las CTR es que permiten estimar el **tiempo hasta la muerte** (TTD). Para ello diferentes modelos son posibles como el de Litchfield, que plotea el logaritmo del tiempo de exposición vs las unidades Probit correspondientes a cada mortalidad observada a los diferentes tiempos. De tal forma puede obtenerse el **tiempo letal 50** (LT_{50}) o **tiempo medio hasta la muerte** (MTTD).

El valor de **incipiencia** es el umbral de concentración o tiempo a partir de la cual se comienzan a observar efectos adversos. Es común en ecotoxicología expresar el valor de incipencia en términos de la LC_{50} (Figura 4.7.A), a partir de graficar las LC_{50} obtenidas a diferentes tiempos de exposición. La asíntota de la función que se obtiene es la **LC_{50} de incipencia** que corresponde con el valor límite al que tendería dicho parámetro a tiempo infinito ($LC_{50_{\infty}}$). Ese valor indicaría la concentración por debajo de la cual el 50% de los individuos vivirán indefinidamente sin padecer los efectos letales que induce la sustancia. Menos utilizado, es el valor de incipencia estimado a partir de la LT_{50} (Figura 4.7.B). En este caso se obtiene graficando el logaritmo de la concentración vs. el logaritmo de la LT_{50} obtenida a diferentes concentraciones.

Tipos de efectos inducidos por los contaminantes

Las respuestas tóxicas pueden ser diferenciadas según la proximidad entre el sitio de exposición química y el sitio o sitios de acción molecular. Los **efectos locales** son aquellos que ocurren donde el tóxico y el sistema biológico primero hacen contacto. Tales efectos son producidos por la ingestión de sustancias tóxicas o la inhalación de materiales irritantes. Ejemplo de ello son sustancias altamente reactivas, como ácidos y bases fuertes. El cloro gaseoso al ser inhalado reacciona con el tejido pulmonar en el sitio de contacto, causando daño e hinchazón de los pulmones, con consecuencias posiblemente fatales, a pesar de que muy poca sustancia química se absorbe en el torrente sanguíneo. Por otro lado, los **efectos sistémicos** son aquellos que requieren la absorción y distribución del tóxico desde su punto de entrada a un sitio distante donde se producen los efectos nocivos. La mayoría de las sustancias, producen este tipo de efecto. En algunos casos, las sustancias pueden causar efectos locales y sistémicos simultáneamente. La mayoría de los químicos que producen toxicidad sistémica no causan una toxicidad de similar grado en todos los órganos; en cambio, generalmente provocan su mayor toxicidad en solo uno o dos órganos. Estos sitios se conocen como **órganos diana** y no necesariamente son los sitios donde la sustancia química alcanza la mayor acumulación. Esto es particularmente cierto para sustancias lipofílicas como el DDT que se acumulan más en el tejido adiposo que en el sistema nervioso donde generan el efecto tóxico. Este hecho ha sido especialmente relevante, por ejemplo, para las aves migratorias que durante los meses de verano acumulaban el insecticida en la grasa corporal sin manifestar ningún efecto adverso. Luego, al quemar las grasas durante la migración en el otoño, el DDT era liberado a la sangre, acumulándose ahora en el cerebro y el sistema reproductivo, lo que causaba en las aves efectos letales agudos por neurotoxicidad y disminución del éxito reproductivo, respectivamente. Entre los efectos sistémicos, no sólo deben considerarse aquellos ocurridos sobre órganos diana sino también los efectos tóxicos **no dirigidos a órganos diana** específico como los generados por sustancias carcinogénicas que pueden actuar sobre diferentes órganos de manera inespecífica.

La **alometría** es un factor importante que suele modificar los efectos inducidos por los contaminantes, dado que al aumentar el tamaño se modifican las relaciones superficie/volumen y por tanto las tasas de incorporación y eliminación y por lo tanto la acumulación de las sustancias. Se ha observado que es posible establecer para una misma especie una relación entre la toxicidad de una sustancia y el peso del organismo de acuerdo a la ecuación:

$$\log LC_{50} = \log a + b \times \log peso$$

O lo que es igual:

$$LC_{50} = a \times peso^b$$

La exposición repetida a un químico puede reducir la respuesta tóxica, mediante un proceso llamado **tolerancia o aclimatación**. La **tolerancia disposicional** se da cuando la cantidad de una sustancia que alcanza el sitio de acción disminuye con el tiempo, por ejemplo, por activación del sistema de detoxificación, reduciendo la respuesta en el tejido. Por otra parte, la **tolerancia**

química o celular puede resultar de una menor disponibilidad de receptores y/o mediadores (por ejemplo, neurotransmisores) producto, por ejemplo, de una inhibición de la expresión de los mismos. En particular, cuando sustancias relacionadas estructuralmente causan una respuesta disminuida, ocurre lo que se conoce como **tolerancia cruzada**.

Por otra parte, mientras algunos efectos son **reversibles**, otros son **irreversibles**. La probabilidad de que el efecto se revierta una respuesta tóxica depende en gran medida de la capacidad de un tejido lesionado para adaptarse, reparar y regenerarse. Por lo tanto, para tejidos como el hígado y el tracto gastrointestinal que tienen una alta capacidad de regeneración, muchas lesiones son reversibles. Existen límites para esta capacidad de reparación, y las dosis muy altas pueden abrumar esta respuesta adaptativa que conduce a la pérdida permanente de la función y la insuficiencia hepática potencialmente mortal.

De acuerdo a la velocidad con la que las sustancias actúan luego de la exposición, los efectos pueden dar lugar a una **toxicidad inmediata**, generalmente cuando se trata de altas dosis de estos químicos que pueden tener efectos rápidos en los sistemas cardiovascular, respiratorio y neurológico que culminan en la muerte en minutos. Por otro lado, otras sustancias pueden producir **toxicidades retardada** ya que pueden manifestarse luego de meses o años de ocurrida la exposición, esto es característico de sustancias carcinogénicas.

En cuanto a la duración y la frecuencia de las exposiciones, en *toxicología*, los efectos se diferencian en agudos, subagudos, subcrónicos y crónicos. Las exposiciones agudas se consideran como exposiciones únicas, a una concentración de la sustancia relativamente elevada y de una duración no mayor a 24h. Las demás, se consideran como exposiciones repetidas a concentraciones generalmente más bajas, en el caso de las subagudas por un período de hasta 1 mes, las subcrónicas hasta 3 meses y las crónicas por periodos de más de 3 meses hasta años.

En *ecotoxicología*, dada la diversidad de organismos que se utilizan en los ensayos de toxicidad, tal clasificación no es tan precisa y dependerá mucho de la duración del ciclo de vida de cada especie. Suele considerarse una evaluación de **efectos agudos** aquellos que se manifiestan en horas, generalmente analizados a 24h, 48h y hasta 96h. En el caso de los **efectos crónicos** las duraciones son mayores, considerándose un periodo no menor al 10% de la duración del ciclo de vida de la especie utilizada. Aunque, muchas veces los límites entre las exposiciones agudas y crónicas suelen ser borrosos, los efectos tóxicos en cada caso suelen ser bien distintos. Por ejemplo, en organismos acuáticos, los efectos agudos inducidos por el Cd suelen estar relacionados principalmente al desbalance iónico del Ca^{+2} en el plasma que producen hipocalcemia que, a su vez, provocan la disfunción cardíaca que conduce a la muerte de los individuos. Por otro lado, los efectos crónicos se asocian principalmente a la interferencia con la señalización celular que puede, por ejemplo, provocar la disrupción del sistema endócrino.

Para varios organismos acuáticos, los bioensayos crónicos suelen tener una duración de 28d. Sin embargo, la duración varía mucho entre especies, por ejemplo, para la OECD, la duración de un ensayo crónicos con abejas (*Apis mellifera*) tiene una duración de 10d mientras que con roedores tiene una duración de hasta 12 meses.

Dada la dificultad y el costo de realizar ensayos tan prolongados la USEPA, por ejemplo, considera la estimación de concentraciones crónicas seguras a partir de ensayos agudos con estadios de vida críticos. Por ejemplo, la estimación de la **concentración máxima aceptable** para un tóxico (MATC) a partir de bioensayos con estadios tempranos (ELS), mediante la exposición de embriones durante la incubación y las larvas durante 30 días después de la eclosión. Sin embargo, es importante tener presente que la relevancia de dichos ensayos ha sido cuestionada, dado que no siempre los estadios más tempranos son los más críticos y en estudios ecológicos las edades con mayor valor reproductivo pueden ser de las de mayor importancia y ciertos contaminantes, como los disruptores endócrinos, afectarlas específicamente.

Dado que en ecotoxicología la disponibilidad de información sobre toxicidad aguda suele ser mucho mayor que para crónica, la USEPA ha propuesto el cálculo de la **relación agudo crónico** (ACR) como:

$$ACR = \frac{LC_{50}}{MATC}$$

Donde, MATC (concentración máxima aceptable) se obtiene a partir de la ecuación:

$$MATC = \sqrt{NOEC \times LOEC}$$

En la cual, LOEC y NOEC son la concentración de no efecto y la más baja que produce efecto para puntos finales crónicos. En este contexto, la relación ACR puede ser utilizada como un factor de corrección de datos de toxicidad aguda para estimar las MATC asociada a niveles de efectos crónicos.

Efecto de las mezclas

Por lo general en el ambiente los contaminantes no se encuentran solos, sino que se hallan acompañados de muchos otros contaminantes. Incluso, en los productos comerciales se encuentran en formulaciones que contienen varias sustancias juntas. Por tanto, comprender la toxicidad de las mezclas es un tema de relevancia en la ecotoxicología. Cuando en una mezcla binaria una sustancia se encuentra a niveles tóxicos y la otra a una concentración muy por debajo del nivel al que induce toxicidad, pero incrementa la toxicidad de la primera, se dice que la mezcla causa una **potenciación** del efecto tóxico. Un ejemplo clásico es la potenciación de la neurotoxicidad inducida por los piretroides al combinarlos con butóxido de piperonilo (BOP). Ello se debe a que el BOP es un fuerte inhibidor del citocromo P450 que contribuye a la detoxificación de los piretroides y por tanto incrementa el tiempo medio de residencia del insecticida en los tejidos y por tanto su concentración interna. Si ambas sustancias en la mezcla binaria se presentan a concentraciones en las que despliegan efectos tóxicos, se dirá que la mezcla causa **aditividad**, **sinergia** o **antagonismo** de los efectos tóxicos, cuando la mezcla posea un efecto igual, mayor o menor a la suma de los efectos causados por las dos sustancias por separado, respectivamente. El antagonismo puede ser **funcional**, si las dos sustancias inducen efectos opuestos en una función bioquímica o fisiológica, **químico**, si las dos sustancias reaccionan entre sí para dar un producto menos tóxico, **disposicional** si la interacción afecta la

absorción, distribución, biotransformación y eliminación de las sustancias en la mezcla, o de **receptor** cuando ambas sustancias compiten por el mismo receptor.

Para comparar la toxicidad de dos sustancias diferentes en una mezcla es útil expresar los efectos que inducen en **unidades tóxicas** (TU) que se obtiene como la fracción de la $LC50_{(t)}$ o más estrictamente del valor de incipencia ($LC50_{(t\infty)}$) obtenido según la fórmula:

$$TU = \frac{\text{Concentración de exposición}}{LC50_{t\infty}}$$

Por consiguiente, si las $LC50_{(t\infty)}$ de la sustancia A y B son 2 y 5 mg/L, respectivamente, para obtener una mezcla que posea 0,5 UT de A y 0,5 UT de B debiera tener 1 y 2,5 mg/L de A y B respectivamente. Si el efecto de la mezcla fuere aditivo, el efecto hallado en dicha mezcla debiera ser el equivalente a 1 UT, ello es 50% de mortalidad. Si obtuviera una mortalidad mayor ($UT_{mezcla} > 1$) entonces el efecto sería sinérgico y si fuera menor al 50% ($UT_{mezcla} < 1$) el efecto sería antagónico. Ello se puede calcular mediante el **índice de aditividad** que se calcula del siguiente modo:

$$S = \frac{LC50_{Am}}{LC50_A} + \frac{LC50_{Bm}}{LC50_B}$$

Donde, $LC50_{Am}$ y $LC50_{Bm}$ son las concentraciones de A y B en la mezcla que produce el 50% de mortalidad y $LC50_A$ y $LC50_B$ las concentraciones de A y B que producen el 50% de mortalidad de forma separada. La suma de las contribuciones tóxicas puede graficarse como se muestra en la [Figura 4.8](#).

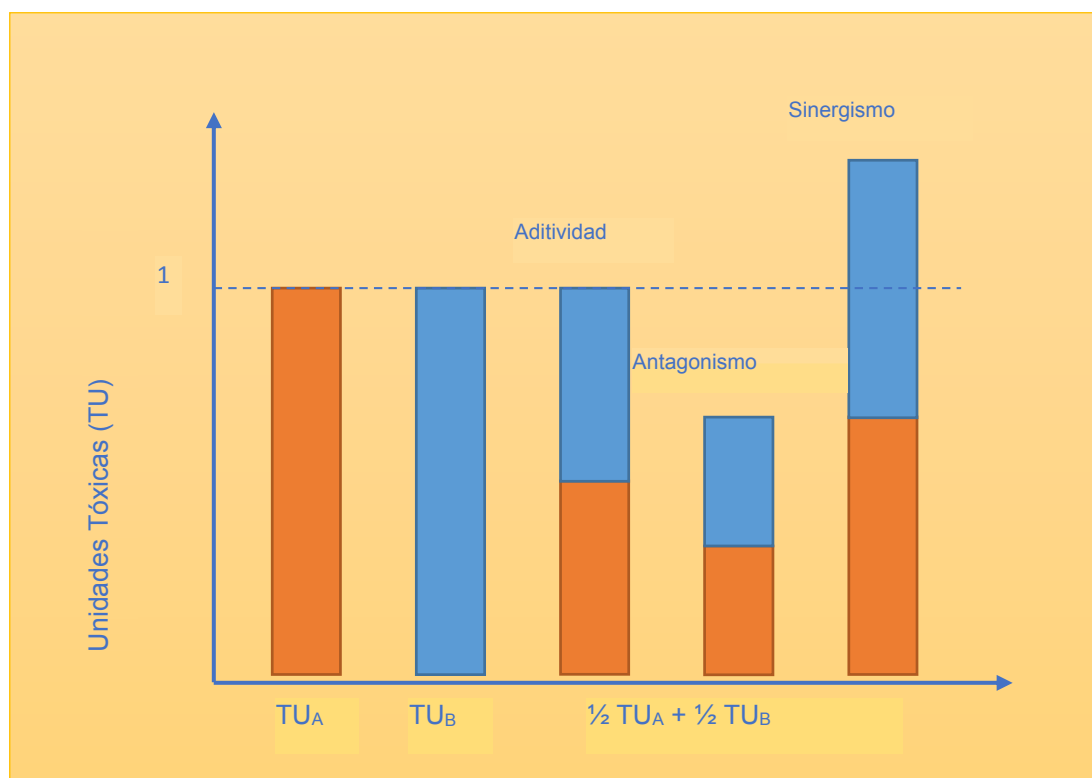


Figura 4.8: Suma de las contribuciones tóxicas en una mezcla binaria

Otra forma de analizar la aditividad en las mezclas es a través del gráfico de isobola (Figura 4.9.). En el mismo se compara cuantas unidades tóxicas de cada sustancia en la mezcla binaria son necesarias para obtener una respuesta de una unidad tóxica (ej. 50% mortalidad) en la mezcla y se compara contra el caso que la interacción en la mezcla sea de tipo aditivo representado por la diagonal del gráfico. En caso de caer por debajo de dicha diagonal la mezcla será sinérgica y si cae por encima de la misma será antagonista.

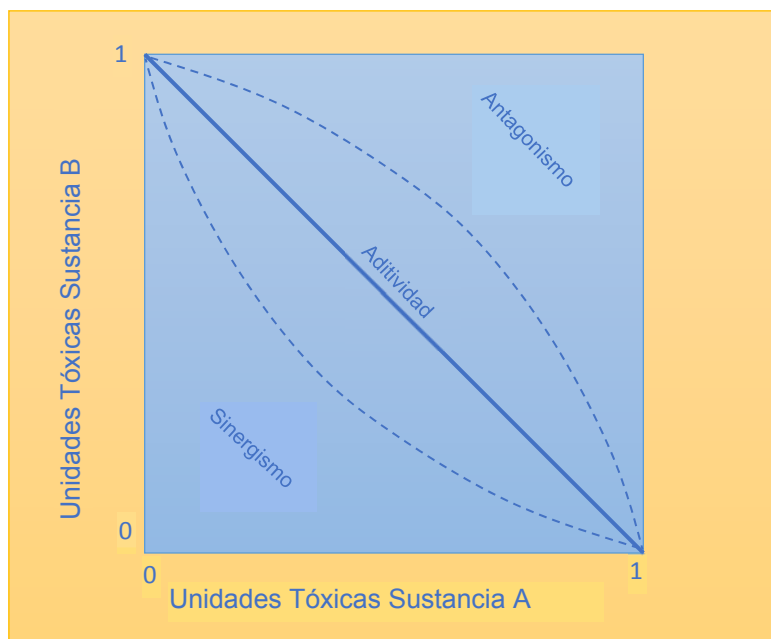


Figura 4.9: Gráfico de Isobola

Dado que la relación entre concentración y efecto (ej. letal) no es lineal si no que sigue en general una reacción sigmoidea, cuando se trabaja lejos de la LC50, suele ser más apropiado sumar los efectos en términos del logaritmo de la concentración y las unidades Probit para linealizar la relación.

Un abordaje conveniente, es evaluar el efecto de las mezclas de acuerdo al modo de acción tóxica de las diferentes sustancias. En función de ello se han propuesto diferentes modelos que contribuirían a explicar la interacción de las sustancias en las mezclas para inducir los efectos adversos. El modelo de adición de concentraciones (CA), el modelo de acción independiente (IA) y el modelo de interacción simple (SI). En el modelo CA se asume que las sustancias poseen el mismo modo de acción y que su acción conjunta es de una forma aditiva luego de normalizar la toxicidad en función de la potencia de cada una. Por consiguiente, luego de dicha normalización, la toxicidad de la mezcla puede predecirse a partir de la sumatoria de las concentraciones normalizadas de cada tóxico en la mezcla según la siguiente ecuación:

$$ECx_{mix} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{ECx_i} \right)^{-1}$$

Donde x : es la proporción del efecto observado, p_i : la proporción de la sustancia i en la mezcla, n : el número de sustancias en la mezcla, y ECx_i : la concentración de la sustancia i que produce el efecto x . En general la fórmula se expresa en términos de TUs, como sigue:

$$TUs = \left(\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{ECx_i} \right)^{-1}$$

Donde, C_i es la concentración de la sustancia i en la mezcla.

En el modelo de IA, se asume que las sustancias poseen un modo de acción diferente y por tanto que su acción es independiente. Conceptualmente, este modelo es un enfoque estadístico para predecir la probabilidad de que ocurra uno de múltiples eventos posibles. En este caso, la toxicidad de la mezcla se estima como:

$$ECx_{mix} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - ECx_i)$$

Donde ECx_{mix} : es el efecto esperado en la mezcla y ECx_i el efecto esperado a partir de la sustancia i .

En el modelo de SI, se asume una interacción entre las sustancias gobernada por el efecto de potenciación descrito previamente. Una sustancia a una concentración mucho menor a la que causa toxicidad incrementa la acción tóxica de otra sustancia evaluada a concentraciones a las que sí produce efecto. En general no existe un modelo formal para evaluar SI, si no que tales interacciones se descubren a partir del apartamiento que posee el comportamiento de estas mezclas respecto de los modelos anteriores. Para ello se suele calcular la proporción de desviación del modelo (MDR) de acuerdo a:

$$MDR = \frac{ECx_{mix} \text{ esperada}}{ECx_{mix} \text{ observada}}$$

Un concepto ampliamente utilizado para comparar la toxicidad relativa de diferentes compuestos que poseen el mismo modo de acción (ej. dioxinas y PCBs o estrógenos) es el de toxicidad equivalente (TEQ) que se define como la toxicidad proporcional de un compuesto dado de la familia respecto a otro que se utiliza como referencia, por ejemplo, para las dioxinas la 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina o para los estrógenos el estradiol (E_2). Para ello se puede calcular el factor de toxicidad equivalente como sigue:

$$TEF = \frac{ECx_i}{ECx_{ref}}$$

Donde, ECx_i : es la concentración efectiva del compuesto i y ECx_{ref} es la concentración efectiva del compuesto de referencia. Por ejemplo, el TEF de la 1,2,3,7,8-pentacloro-dibenzo-p-dioxina es de 0,5, ello quiere decir que su afinidad por el receptor arilo (AhR) es la mitad que la de la dioxina de referencia y por tanto se necesitará el doble de concentración para inducir la misma respuesta. Por consiguiente, para estimar su contribución a la inducción del receptor en una muestra, su concentración deberá multiplicarse por 2.

Vías de efectos adversos

La ecotoxicología requiere del desarrollo de un marco conceptual dentro del cual los datos y el conocimiento recopilados en diferentes niveles de organización biológica puedan ser sintetizados de una manera simple que puedan ser fácilmente incorporados en la evaluación de riesgo ecológica. Un paradigma que ha surgido recientemente para dilucidar los vínculos entre respuestas observadas a diferentes niveles de organización es el concepto de "Vía de Efectos Adversos" (AOP). Sus inventores, Gary Ankley y colaboradores, lo ha definido como "una construcción conceptual que retrata el conocimiento existente sobre el vínculo entre un efecto iniciador molecular directo (por ejemplo, una interacción molecular entre un xenobiótico y una biomolécula específica) y un efecto adverso a un nivel de organización biológica relevante para la evaluación de riesgos". En el ámbito de la ecotoxicología y la evaluación del riesgo ecológico, la población es el nivel generalmente de mayor relevancia. El desarrollo del concepto de AOP ha incorporado principios como el de buenas prácticas para la armonización internacional de los enfoques y bases de datos y la integración de herramientas computacionales y de modelado. El marco conceptual (Figura 4.10.) intenta explicar de manera mecanística la relación entre la acción del contaminante a nivel de su interacción molecular (Ancla 1) y los efectos adversos inducidos a nivel del organismo o de la población (Ancla 2).



Figura 4.10: Marco conceptual de las Vías de Efecto Adverso (AOPs)

Bibliografía

- Ashauer, R., O'Connor, I., Hintermeister, A., Escher, B.I., 2015. Death Dilemma and Organism Recovery in Ecotoxicology. *Environmental Science & Technology* 49, 10136-10146.
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., 2007. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated environmental assessment and management* 3, 364-372.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., López, G.C., Ronco, A.E., Somoza, G.M., 2009. Effects of cypermethrin chronic exposure and water temperature on survival, growth, sex differentiation, and gonadal developmental stages of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei). *Chemosphere* 76, 374-380.
- Carriquiriborde, P., Handy, R.D., Davies, S.J., 2004. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *Journal of Experimental Biology* 207, 75-86.
- Carriquiriborde, P., Marino, D.J., Giachero, G., Castro, E.A., Ronco, A.E., 2012. Global metabolic response in the bile of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces) sublethally exposed to the pyrethroid cypermethrin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 76, 46-54.
- Carriquiriborde, P., Ronco, A., 2002. Sensitivity of the neotropical teleost *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae) to chromium(VI), copper(II), and cadmium(II). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 294-301.
- Escher, B.I., Hermens, J.L.M., 2002. Modes of action in ecotoxicology: Their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4201-4217.
- Klaassen, C.D., 2019. Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons (Ninth Edition) McGraw-Hill Education, New York.
- López Aca, V., Gonzalez, P.V., Carriquiriborde, P., 2018. Lethal and sublethal responses in the fish, *Odontesthes bonariensis*, exposed to chlorpyrifos alone or under mixtures with endosulfán and lambda-cyhalothrin. *Ecotoxicology* 27, 968-979.
- Newman, M.C., 2015. *Fundamentals of Ecotoxicology The Science of Pollution* (4th). CRC Press, Boca Raton, FL.
- OECD, 2018. Test No. 452: Chronic Toxicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 OECD, Paris, 18 pp doi:<https://doi.org/10.1787/9789264071209-en>.
- Paracampo, A., García, I., Mugni, H., Marrochi, N., Carriquiriborde, P., Bonetto, C., 2015. Fish assemblage of a Pampasic stream (Buenos Aires, Argentina): temporal variations and relationships with environmental variables. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 50, 145-153.
- Renner, R., 2004. Redrawing the Dose-Response Curve. *Environ. Sci. Technol.* 38, 00A-05A.
- USEPA, 2002. Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, Fourth Edition. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, EPA-821-R-02-013, Washington, DC.