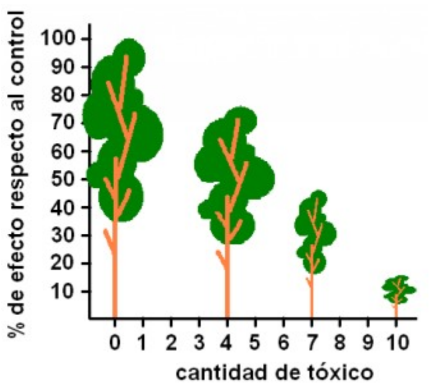
1. ¿Qué es la hormesis?

Quizás, para comenzar a explicar que es la hormesis, conviene explicar que tipo de relación existe entre la cantidad de un tóxico que está afectando a un organismo y el efecto que tiene sobre éste. El caso más sencillo de comprender es el siguiente:

Imaginemos que tenemos 4 macetas, cada una con una semilla de la misma especie de arbol. En la tierra de una maceta ponemos 10 unidades de tóxicos, en otra 7, en otra 4 y en la última nada. El tiesto en el que no ponemos ningún tóxico es nuestro control, que servirá para comparar que pasa en los casos en que hemos añadido tóxico a la maceta.

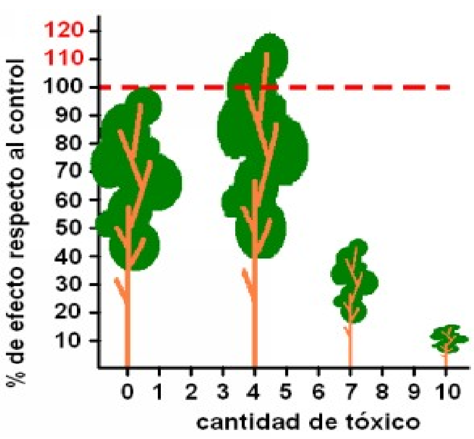


Gráfica 1

Una vez que hayan crecido los árboles, medimos su altura (o parámetro). Su altura nos servirá para conocer cómo el tóxico ha afectado al crecimiento (o sea la respuesta del organismo). El resultado es el mostrado en la gráfica 1. El árbol que ha crecido sin ningún tóxico en la maceta ha crecido hasta una altura determinada, mayor que la alcanzada por ninguno de sus hermanos. Es la altura de referencia, la altura control, y establecemos que es el 100%.

Ahora que ya tenemos un patrón, podemos medir el resto de árboles y referir su altura en relación a la que alcanzó el árbol control. Así vemos que una cantidad de 4 unidades de tóxico en la maceta, provoca que la altura del árbol sea tan solo de un 80% de la que le correspondería si éste hubiera crecido sin la presencia del tóxico. Lo mismo para las otras dos macetas con tóxico, observamos que con 7 unidades de tóxico, la altura del árbol será de un 50% y con 10 unidades, de un 20%.

Ahora imaginemos que repetimos el experimento y obtenemos el resultado mostrado en la siguiente gráfica 2:



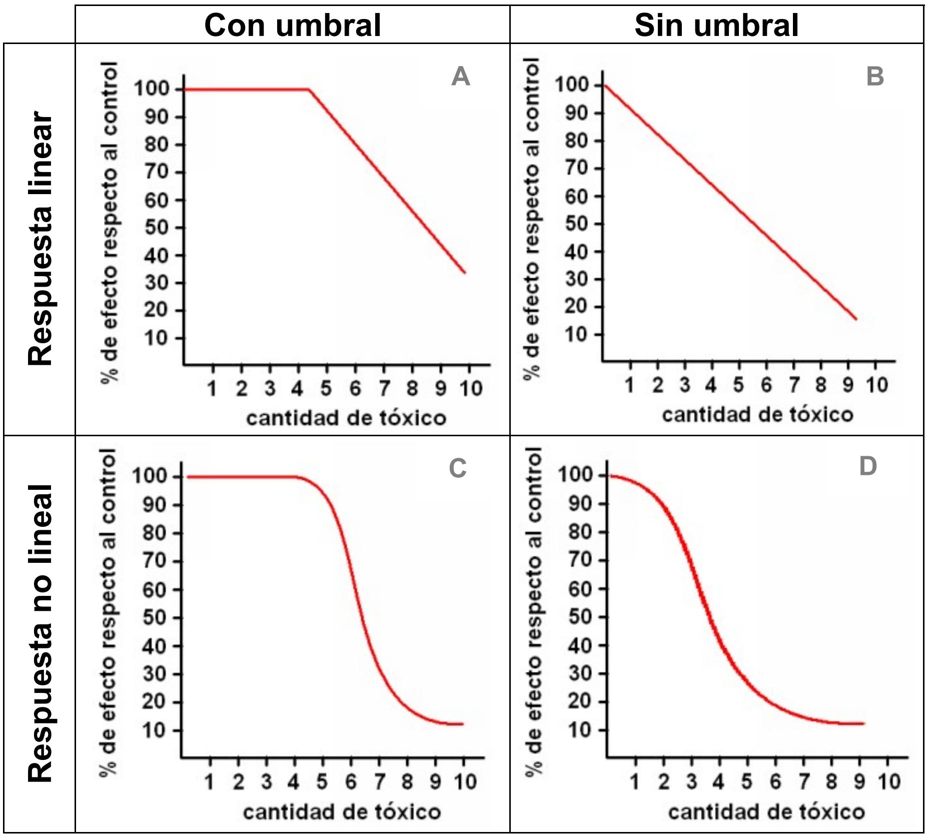
Gráfica 2

Ahora resulta que el árbol que ha crecido en la maceta que contenía la cantidad (o dosis) más baja de tóxico (4 unidades), ha crecido por encima del árbol que ha crecido sin la presencia de tóxico. Mientras que si se continúa incrementando la cantidad de tóxico en las macetas, obtendremos el mismo efecto que en el primer experimento.

¿Es eso posible? Pues si, en la naturaleza, en numerosas ocasiones se da este caso. Ciertos productos a bajas dosis, producen una estimulación del parámetro que estamos estudiando; mientras que a altas dosis mantiene su efecto nocivo, reduciendo el valor del parámetro. Es un efecto en el que se basa por ejemplo la HOMEOPATIA. La homeopatía intenta estimular ciertas reacciones en el cuerpo humano, usando dosis extremadamente bajas de compuestos, que a mayores dosis pueden resultar tóxicos.

2. ¿Qué tipos de respuesta podemos encontrar al trabajar con tóxicos?

Dependiendo de cómo reacciona el organismo al incremento de la dosis de tóxico, tenemos básicamente dos grandes grupos de respuesta con dos subtipos, que podríamos presentar en la siguiente tabla:



Gráfica 3

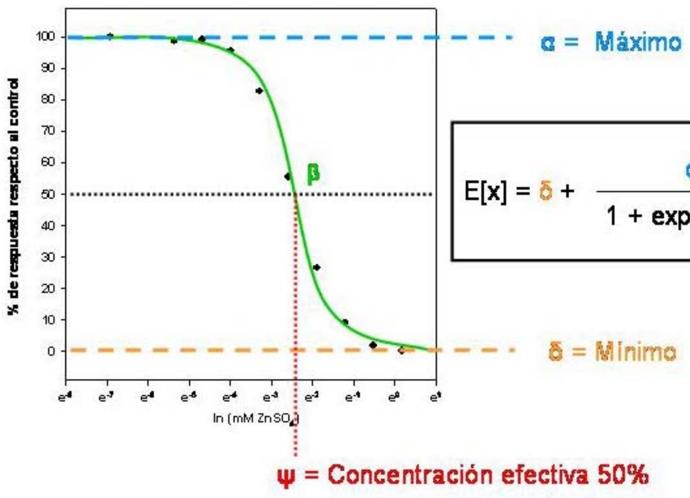
La respuesta lineal (tabla 3.B y 3.B en la zona de caída de las gráficas) es aquella en que a un aumento de 1 unidad de dosis se corresponde siempre con el mismo aumento proporcional del efecto, nos encontremos en la región que nos encontremos (bajas, medias o altas dosis). En cambio en el modelo no lineal (ver graficas ejemplo un incremento de una unidad no tendrá siempre el mismo efecto, si nos encontramos por ejemplo en la región de dosis bajas (de 0 a 2 cantidades de tóxico en la tabla 3.D) la respuesta será mínima (el incremento de 1 a 2 unidades de tóxico pasamos de una respuesta del 95 al 90%, o sea una caída del 5%), apenas supone una caída del efecto del 5%), mientras que si incrementamos 1 unidad de tóxico en la región de máxima sensibilidad tendremos una respuesta mucho mayor (de 3 a 4 unidades de tóxico tenemos un efecto que va del 60 al 40%, o sea una caída del 20 % para un incremento de una sola unidad de tóxico).

Generalmente, los organismos suelen comportarse ante los tóxicos tal y como muestra la tabla 4.C. O sea, ante bajas concentraciones de tóxico no hay una respuesta que sea posible medir, y a partir de una cierta dosis (llamada *FEC; First Effect Concentration* o *LOEC Lowest Observed Effect Concentration*) comienza a notarse el efecto del tóxico.

3. Modelos dosis-respuesta: logístico y logístico con hormesis

Son numerosos los modelos matemáticos que tratan de ajustarse a las respuestas mostradas en la gráfica 3. El hecho de ajustar unos datos a un modelo (ecuación matemática) nos permitirá conocer el efecto que tendrán concentraciones del tóxico situadas entre los valores que hayamos utilizado en nuestros experimentos. Siguiendo con el ejemplo de la gráfica 1, si quisiéramos conocer con exactitud que altura alcanzaría un árbol plantado en una maceta con 5 o 6 unidades de tóxico, tendríamos que intentar modelar la ecuación que se ajuste mejor a los datos experimentales obtenidos, ya que nosotros solo hemos utilizado los valores 0, 4, 7 y 10, y tan solo conocemos por tanto, la altura que alcanzarán los árboles plantados en esas condiciones.

Aquí vamos a tratar básicamente del modelo que se ajustaría a la gráfica 3.C llamado logístico. Podemos ver su ecuación y su representación en la gráfica 4.



$$E[x] = \delta + \frac{\alpha - \delta}{1 + \exp\left[\beta \ln (x/\psi)\right]}$$

Gráfica 4

E[x] sería el efecto que una concentración X tendría sobre el parámetro estudiado. El término “exp” representa al número **e** (2.71828) elevado a lo que contiene el paréntesis que le sigue. El significado de las constantes de la ecuación es la siguiente:

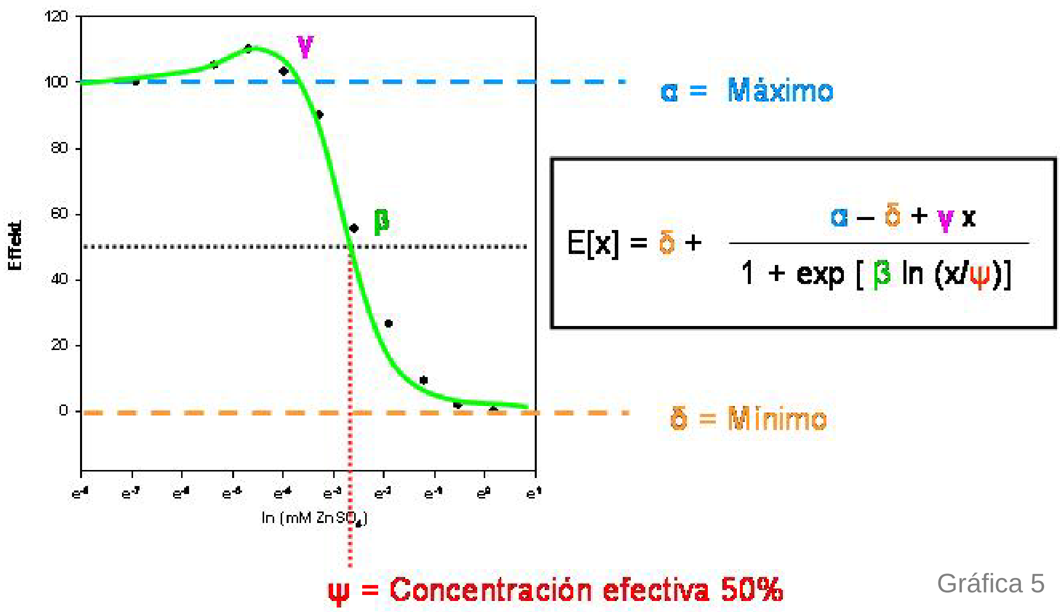
α: es el valor del máximo valor de la respuesta, siempre alrededor del 100% y correspondiente al valor del control.

β: es un valor relacionado con la inclinación de la parte central de la gráfica, y podría relacionarse con la sensibilidad que presenta el organismo al incremento de la dosis del tóxico.

ψ: es el valor de la concentración efectiva 50 (EC_{50} es la concentración de tóxico que provoca una respuesta del 50% al compararlo con el control)

δ: es el valor mínimo que se alcanza durante el experimento.

En el caso que aparezca la hormesis, la ecuación que mejor se ajustará a los datos, necesitará de una constante más que modele el incremento en la respuesta que se da a las bajas concentraciones del tóxico. Ésta modificación fue sugerida por P. Brain y R. Cousens (ver Bibliografía).



Gráfica 5

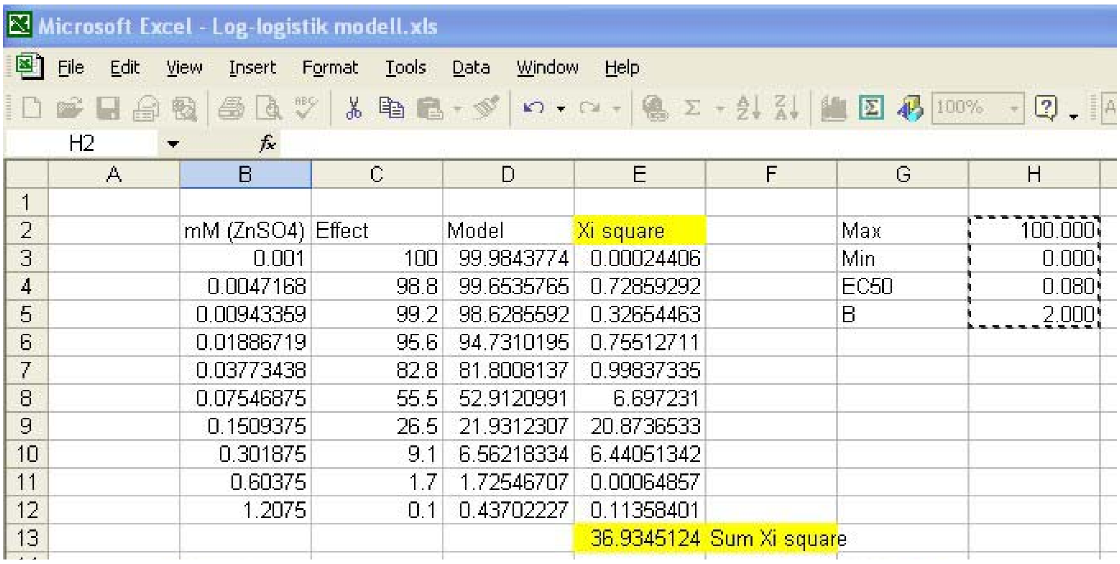
Se añade, al modelo logístico, un parámetro **γ** que se relaciona con el incremento en la respuesta (hormesis) a bajas concentraciones de tóxico, tal y como se muestra en la gráfica 5.

4. ¿Cómo puedo ajustar mis datos a un modelo?

Esa es una buena pregunta. Pero…¿qué es ajustar? Ajustar sería el tedioso proceso de encontrar los valores de las constantes antes descritas (**α, β, ψ, δ…**) para los que nuestra ecuación se asemeje lo más posible a nuestros datos. Dicho de otro modo, si encontramos los mejores valores posibles de esas constantes, nuestra ecuación deberá devolver los valores de altura que hemos medido en nuestros árboles, cuando como valor de la X hayamos introducido los valores de unidades de tóxico utilizados en el experimento. Existen en el mercado numerosos programas que permiten ajustar ecuaciones a nuestros datos, pero el procedimiento que voy a explicar aquí se puede llevar a cabo de modo “manual” utilizando “Excel” de Microsoft; mi elección se ha basado simplemente en el hecho de que este programa es el más sencillo de utilizar y el más extendido y por ello será de utilidad a un mayor número de usuarios.

El primer paso será copiar los datos en nuestra hoja, con el formato que se muestra en la gráfica 6. En la columna B hemos colocado las concentraciones crecientes de tóxico, y en la C el resultado de medir el efecto sobre nuestros organismos. Para el caso estamos utilizando datos del efecto que el Sulfato de Zinc tiene sobre la fluorescencia de ciertas bacterias que la generan, y que al ser expuestas a productos tóxicos se verá afectada. Además en la columna G y H colocamos el nombre de la constante a estimar.

Es importante saber que para poder estimar los valores de las constantes debemos partir de algunos aproximados, para que así EXCEL pueda luego ir aproximándolos al mejor valor posible.



	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2		mM (ZnSO4)	Effect	Model	Xi square		Max	100.000
3		0.001	100	99.9843774	0.00024406		Min	0.000
4		0.0047168	98.8	99.6535765	0.72859292		EC50	0.080
5		0.00943359	99.2	98.6285592	0.32654463		B	2.000
6		0.01886719	95.6	94.7310195	0.75512711			
7		0.03773438	82.8	81.8008137	0.99837335			
8		0.07546875	55.5	52.9120991	6.697231			
9		0.1509375	26.5	21.9312307	20.8736533			
10		0.301875	9.1	6.56218334	6.44051342			
11		0.60375	1.7	1.72546707	0.00064857			
12		1.2075	0.1	0.43702227	0.11358401			
13					36.9345124	Sum Xi square		

Gráfica 6

Los valores que se indican en las casillas H2, 3, 4 y 5 se obtienen de la observación de los valores obtenidos. El máximo de partida será 100, el mínimo 0, la EC_{50} será la concentración de tóxico que reduzca la fluorescencia (columna D) hasta el 50%. Si miramos atentamente, el valor que rebajará la fluorescencia (Effect) hasta ese valor se debería encontrar entre las concentraciones de 0.075 y 0.15 mM de ZnSO4, aunque mucho más cerca de 0.075, ya que para esa concentración de tóxico ya casi tenemos una reducción del 50% (valor real de 52.91%). Así que podemos aproximar y escribir la casilla H4 el valor de 0.080. El valor de B, es un valor que suele oscilar entre 1 y 3, así que podemos escribir 2 tranquilamente.

El siguiente paso es escribir el modelo en la casilla D3 de modo que sea calculado el valor del efecto utilizando como X el valor de concentración de la casilla B3. La fórmula que puedes copiar y pegar en la casilla es la siguiente:

=Min + ((Max-Min)/(1+ exp(B*ln(x/EC50))))

Esta es la ecuación logística con sus términos, pero en lenguaje comprensible para EXCEL se transforma en:

=$H$3 + (($H$2-$H$3)/(1+ EXP($H$5*LN(B3/$H$4))))

Utilizamos el símbolo $ para bloquear las celdas correspondientes a las variables y así poder arrastrar la celda B3 una vez escrita para rellenar el resto de celdas. Así obtendríamos los resultados que aparecen en la columna D (titulada modelo).

Ahora tenemos que conocer algo acerca del método que vamos a utilizar para ajustar nuestro modelo. En teoría cuanto mejor sea nuestra estima, la distancia de los valores de mi modelo (columna D) a los reales será la menor posible. Así que vamos calcular las distancias, pero elevándolas al cuadrado, para evitar que las distancias positivas (por exceso) se contrarresten con las distancias negativas (por defecto).

Así que titulamos la columna E como Xi cuadrado y procedemos a insertar la siguiente fórmula:

Distancia^2 = (Valor real – Valor del modelo)^2

y que traducido a lenguaje EXCEL sería:

Distancia^2 = (Valor real – Valor del modelo)^2

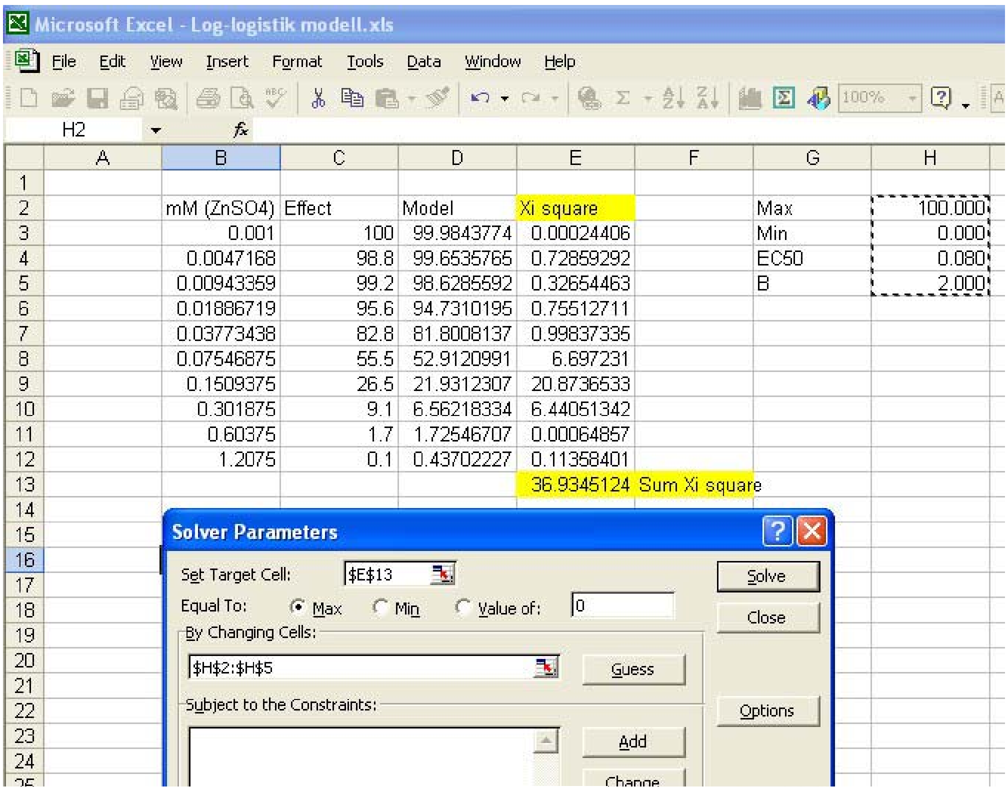
=(C3-D3)^2

Luego arrastramos la celda (copiar) y rellenamos el resto de la columna. Al final de al misma añadimos un sumatorio para todas las distancias:

=suma(E3:E12)

sí hemos entendido todo lo explicado hasta el momento, parece lógico pensar que cuanto menor sea este valor (la suma de las distancias al cuadrado) mejor estará funcionando mi ecuación y mejor estimará los valores reales de mi experimento.

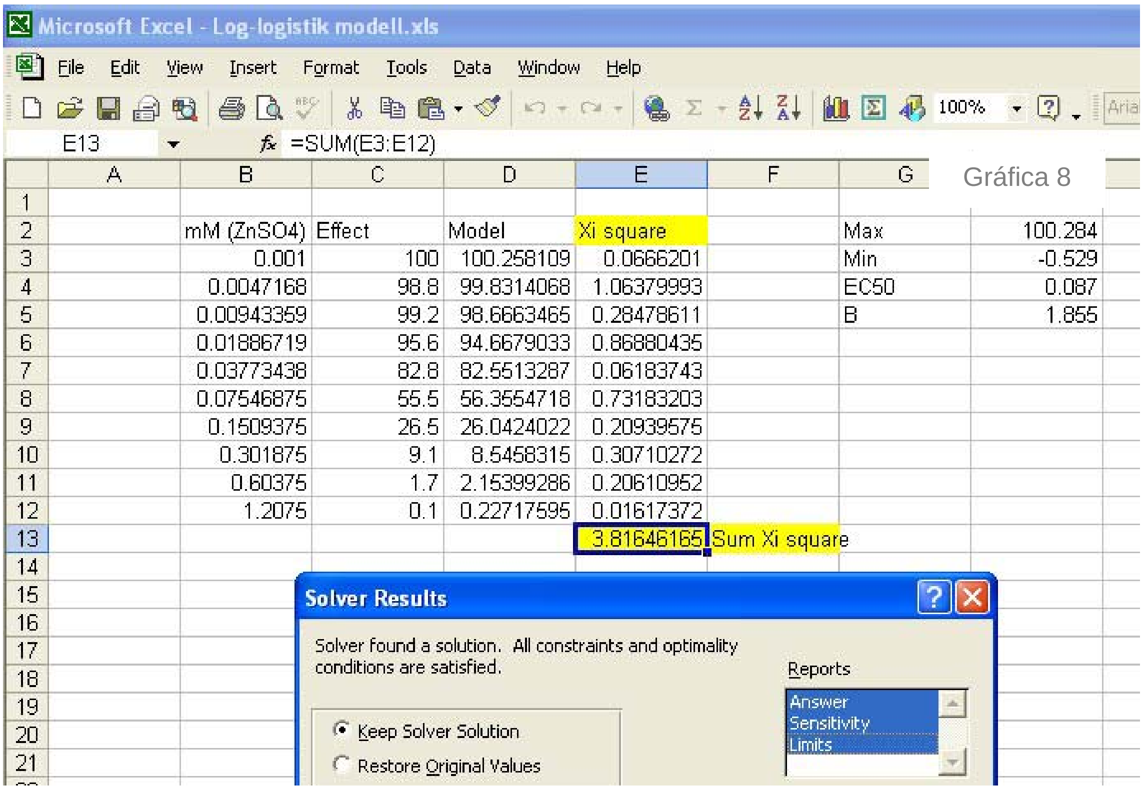
Ahora vamos a explicar como utilizar SOLVER en EXCEL. SOLVER, es una herramienta de análisis que hará en unos momentos lo que nosotros tendríamos que hacer durante horas si quisiéramos ajustar las constantes de nuestra ecuación del mejor modo posible. Si cambiásemos cualquiera de los valores de las casillas de las constantes (por ejemplo en vez de 100 ponemos 90 en el "Max") automáticamente la hoja EXCEL recalcularía los valores de nuestro modelo y de la Suma cuadrática de las distancias (que en este caso se habría incrementado).



Gráfica 7

Así que puedes imaginar el trabajo de hacer pruebas con valores diferentes de las 4 constantes hasta obtener el menor valor posible de esta suma. Es un trabajo inimaginable. SOLVER lo hará por nosotros.

La herramienta SOLVER aparece en el menú HERRAMIENTAS. Si no aparece deberemos ir a COMPLEMENTOS (dentro también del menú herramientas) y marcar la casilla correspondiente para que EXCEL lo instale y nos aparezca como opción en el menú contextual HERRAMIENTAS. Una vez activado SOLVER, nos aparecerá una ventana como la de la gráfica 7. En ella deberemos seleccionar la celda Objetivo (Set Target Cell) como aquella donde tenemos la suma cuadrática de las distancias ($E$13) y a continuación indicar que queremos que el valor de esa celda sea el menor posible. Para ello el programa deberá cambiar (By Changing Cells) precisamente las celdas que contienen nuestras constantes aproximadas a ojo ($H$2:$H$5). Ahora ejecutamos SOLVER (gráfica 8) y el programa nos devolverá los valores de las constantes que hacen que el valor de nuestra suma cuadrática sea lo menor posible. Si aceptamos los cambios propuestos, las casillas correspondientes a las constantes del modelo, habrán cambiado.



	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2		mM (ZnSO4)	Effect	Model	Xi square		Max	100.284
3		0.001	100	100.258109	0.0666201		Min	-0.529
4		0.0047168	98.8	99.8314068	1.06379993		EC50	0.087
5		0.00943359	99.2	98.6663465	0.28478611		B	1.855
6		0.01886719	95.6	94.6679033	0.86880435			
7		0.03773438	82.8	82.5513287	0.06183743			
8		0.07546875	55.5	56.3554718	0.73183203			
9		0.1509375	26.5	26.0424022	0.20939575			
10		0.301875	9.1	8.5458315	0.30710272			
11		0.60375	1.7	2.15399286	0.20610952			
12		1.2075	0.1	0.22717595	0.01617372			
13					3.81646165	Sum Xi square		

Gráfica 8

Cómo observamos, los valores calculados a ojo (100/0/0.08/2) eran bastante cercanos a la realidad (100/-0.5/0.087/1.855).

5. Bibliografía

Brain, P. and R. Cousens (1989). "An equation to describe dose response where there is stimulation on growth at low doses." Weed Research **29**: 93-96.