

### PREMIO BIOQUÍMICO PROF. DRA. JOSEFINA VARELA

#### Efecto de la exposición transgeneracional al disruptor endócrino di-2-etilhexil-ftalato, sobre la secreción de gonadotrofinas en ratas peripúberes

Carbone S<sup>1,2,3</sup>, Szwarcfarb B<sup>1,2,3</sup>, Reynoso R<sup>1</sup>, Ponzo O<sup>1</sup>, Cardoso N<sup>1</sup>, Moguilevsky J<sup>1,3</sup>, Scacchi P<sup>1,2,3</sup>

Laboratorio de Endocrinología. Depto.de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1</sup>. CONICET<sup>2</sup>.  
Universidad Favaloro<sup>3</sup>

#### INTRODUCCIÓN

Los ftalatos constituyen un grupo de químicos usados como agentes suavizantes para la fabricación del PVC flexible. Representan entre 10-60% del peso de algunos plásticos porque tienen la propiedad de conferirle flexibilidad y transparencia, deseables en la fabricación de productos de este material. Al no estar químicamente ligados al polímero con el cual se mezclan y además poseer propiedades lipofílicas, se pueden liberar y disolver en las grasas de los alimentos y líquidos biológicos. En la población general la vía de exposición es a través de la ingestión, inhalación y/o contacto dérmico con los alimentos, juguetes, material de uso médico (guías endovenosas, bolsas de alimentación enteral, respiradores) y cualquier otro producto que lo utilice en su fabricación<sup>(1,2,3)</sup>.

DEHP (di-2-etilhexil-ftalato) es el ftalato más comúnmente empleado en la industria del plástico. Esta sustancia está incluida entre los tóxicos químicos considerados “disruptores endocrinos o alteradores hormonales”, porque interfieren los sistemas hormonales fisiológicos actuando de diferentes formas: mimetizando y antagonizando su acción y/o alterando su patrón de síntesis. La importancia del efecto del DEHP radica fundamentalmente en que atraviesa placenta, por lo cual la exposición humana puede comenzar en útero a través del efecto tóxico del MEHP (mono-etilhexil-ftalato) que es su principal metabolito<sup>(4)</sup>. Si bien en algunos países de la Comunidad Europea, EE.UU. y Canadá, se ha discontinuado su uso en la fabricación de insumos médicos y productos destinados a los niños, en otros aún sigue empleándose incluso en productos usados en el hogar. No obstante haberse estimado que la exposición humana al DEHP es de 4-30 ug/kg/día<sup>(1)</sup>, muchos individuos están sometidos a una gran exposición, ya sea por actividad laboral o por tratamiento médico. Tal es el caso de los pacientes de diálisis<sup>(5)</sup> y los neonatos prematuros

que requieren cuidados intensivos<sup>(6,7)</sup> y están en contacto con cánulas utilizadas para su tratamiento, las cuales despiden continuamente ftalatos.

DEHP ha sido descrito como potente antiandrógeno en machos. Recientemente se ha demostrado por estudios “in vitro”, que tiene diferentes efectos sobre la actividad transcripcional en receptores humanos pudiendo actuar como agonista vía receptores de estrógenos tipo  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) o como antagonista vía los receptores de estrógenos tipo  $\beta$  (ER $\beta$ ) y los receptores de andrógenos (AR)<sup>(8)</sup>. Este hecho permitiría explicar los efectos adversos del DEHP sobre función gonadal, observadas en ambos sexos.

En el aparato reproductor masculino, DEHP altera la diferenciación sexual y provoca malformaciones gonadales (atrofia de túbulos seminíferos, vacuolización de células de Sertoli, agenesia testicular, criptorquidea) que conllevan a modificaciones en la función testicular como disminución de la espermatogénesis y a cambios en el comportamiento sexual en animales de laboratorio<sup>(9,10,11)</sup>. El mecanismo de toxicidad reproductiva de DEHP estaría relacionado con sus efectos sobre la expresión de genes asociados con el desarrollo testicular y la síntesis de hormonas esteroideas, durante el período crítico de la diferenciación sexual<sup>(9,10)</sup>.

En el sistema reproductor de la hembra, DEHP produce retardo o supresión de la ovulación, supresión de la secreción de estradiol, poliquistosis ovárica, muerte fetal, disminución de edad gestacional, reducción del tamaño de la cría. Se ha evaluado el efecto del DEHP sobre el sistema reproductor de la rata hembra sometida a este disruptor durante el desarrollo (períodos fetal y lactancia), observándose retraso en la aparición de la apertura vaginal y el primer estro. El mecanismo de acción propuesto indicaría que el MEHP (mono-etil-hexil-ftalato), que es

el metabolito activo del DEHP, inhibe la actividad de la aromatasas en las células de la granulosa del ovario, sugiriéndose que actuando a través del receptor inhibiría la producción de estradiol en el ovario, produciendo anovulación<sup>(12, 13)</sup>.

En humanos se ha visto una diferencia sexual en la toxicidad de DEHP, que sería dependiente de la edad y que ocurriría a mayor edad en la mujer que en el hombre<sup>(15)</sup>. Esta observación se fundamenta en el hecho que sus efectos tóxicos sobre del tracto reproductivo masculino se manifestarían fundamentalmente durante el desarrollo; mientras que en la mujer el órgano blanco sería el ovario y su acción consistiría en la alteración del tiempo normal de ovulación, resultando en ciclos hipostrogénicos anovulatorios y ovarios poliquísticos<sup>(14)</sup>. También se ha sugerido un posible rol del DEHP en la inducción o potenciación de una respuesta uterina inflamatoria mediada por la inducción de la secreción de interleuquina-1 en células mononucleares<sup>(15)</sup>, que podría ser la causa de la disminución de la edad gestacional y mayor tasa de abortos observada en mujeres gestantes expuestas al tóxico. Asimismo, se ha propuesto un posible rol de DEHP en la patogénesis de la endometriosis<sup>(14)</sup> y en los mecanismos involucrados en el desarrollo puberal<sup>(16, 17)</sup>.

Si bien existen numerosos estudios de exposición pre y post natal al DEHP, en los que se han reportado presencia de malformaciones en los órganos sexuales, alteraciones en el desarrollo puberal y en la capacidad reproductora en el adulto, no ha sido estudiado aún el efecto de la exposición multigeneracional y transgeneracional al tóxico. Se considera que contribuir a esclarecer este punto podría resultar de importancia teniendo en cuenta que los disruptores endocrinos son sustancias que se caracterizan porque actúan a dosis muy bajas y sus efectos son acumulativos, pudiendo manifestarse en la descendencia.

## OBJETIVOS

La presente investigación fue diseñada con el objetivo de estudiar el efecto sobre la secreción de gonadotropinas, de la exposición transgeneracional a DEHP en ratas inmaduras de 30 días de vida sin exposición directa al tóxico, pero provenientes de progenitores expuestos al disruptor endocrino desde su concepción hasta el momento de su primer apareo.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Animales:

Se utilizaron ratas Wistar adultas de ambos sexos, provenientes del bioterio del Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos

Aires. Los animales pesaron  $260 \pm 30$  g las hembras y  $210 \pm 20$  g. Fueron observadas durante 2 semanas previas a la iniciación de la experiencia, a fin de descartar enfermedades. A través del estudio, los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas de temperatura ( $22-24^{\circ}\text{C}$ ) y bajo un período de luz /oscuridad de 12 hs. (7.00 AM- 7.00 PM). Se les proporcionó agua y una dieta de comida standard de laboratorio. El agua fue previamente analizada, a fin de constatar la ausencia de contaminantes y/o derivados de ftalato. Se tomaron las precauciones para minimizar el dolor y el discomfort de las ratas, de acuerdo a los principios y procedimientos establecidos en el European Communities Council Directives (86/609/EEC) and FRAME guidelines (FRAME Reduction Committee November 1999).

En la primera parte del estudio se realizaron apareos colocando 1 macho y 1 hembra (en período estro del ciclo estral) por caja, durante 4 días. Los animales fueron examinados diariamente para detectar la pérdida del tapón vaginal y se consideró día 1 de la gestación (GD1), el día en que éste fue hallado en el fondo de la caja. En ese momento el macho fue removido de la caja y las ratas hembra preñadas fueron sometidas a diferentes tratamientos. Se trabajó con dos grupos experimentales: grupo control (C) y grupo expuesto al DEHP (DEHP).

### 2. Exposición al DEHP:

A partir del D1 y durante la lactancia, las hembras preñadas fueron expuestas a agua conteniendo 325 ul/l de DEHP (99% de pureza, Cat D 20,115-4 Aldrich Chemical Company, Inc, Milwaukee, Wisconsin, USA). Esta dosis fue elegida de acuerdo a la usada previamente por Arcari y col. (18), preparándose una suspensión homogénea de DEHP en agua libre de contaminantes y empleando para ello un sonicador durante 30 min. El grupo control recibió agua libre del tóxico. A fin de asegurar la ingesta del DEHP, las ratas gestantes fueron pesadas diariamente y se midió el volumen de líquido ingerido. La dosis de DEHP usada fue equivalente a 24 ug/kg/día, estimándose el nivel de exposición humana en población general entre 4-30 ug/kg día.

### 3. Diseño experimental:

Para determinar el número de crías nacidas de cada hembra preñada, las cajas fueron examinadas a intervalos frecuentes durante la gestación. Después del nacimiento las madres siguieron ingiriendo el DEHP en el agua de bebida, colocándose 8 crías por rata madre. Esta proporción se mantuvo mediante el reemplazo de las crías muertas por otras sometidas a igual tratamiento, con el objetivo de permitir un desarrollo del peso similar en cada grupo y así poder controlar la dosis de DEHP in-

gerida. Las crías tratadas fueron expuestas al DEHP durante la lactancia y después del destete, a los 21 días post nacimiento (PND21), fueron separadas por sexo: macho (M) y hembra (H) continuando la ingesta del tóxico en el agua de bebida. Un grupo de estas ratas tratadas y de sus respectivos controles fueron sacrificadas a los 30 días de edad, mientras que las restantes continuaron expuestas al DEHP durante la vida adulta hasta el momento del apareo, para ser usadas en la segunda parte del experimento. Se controló periódicamente el peso, el tiempo de apertura vaginal (como parámetro de desarrollo puberal) y se examinaron los caracteres sexuales secundarios.

En la segunda parte del experimento, que corresponde al estudio del efecto transgeneracional del DEHP, se utilizó las ratas nacidas en el primer ensayo. Cuando éstas alcanzaron el peso adulto, se realizaron apareos y en ese momento se suspendió la exposición al DEHP, reemplazándose por agua libre del disruptor al igual que la proporcionada al grupo control.

Se trabajó con diferentes grupos de apareos (H: hembras y M: machos): H-DEHP + M-DEHP; H-CONTROL + M-DEHP; H-DEHP + M-CONTROL; H-CONTROL + M-CONTROL. El procedimiento respecto al período de gesta fue similar al detallado precedentemente para la primera parte de la experiencia. Luego del nacimiento y durante la lactancia, las crías nacidas de progenitores que habían sido expuestos al DEHP desde su gestación hasta el momento del apareo, continuaron bebiendo agua libre de DEHP durante la lactancia y luego del destete hasta el momento del sacrificio a los 30 días de edad (PND30). Luego del destete de las crías, los progenitores fueron sacrificados y se recogió la sangre para medir los niveles de gonadotrofinas.

#### 4. Recolección de sangre:

Los animales fueron sacrificados por decapitación a los 30 días post natal (PND30). El horario del sacrificio fue entre las 16.00 y 17.00, respetando el ritmo circadiano hormonal de la rata. Las ratas de 30 días son consideradas inmaduras sexualmente, correspondiendo

al período de vida peripuberal. Se recogió la sangre troncal, se centrifugó durante 10 min a 2500 rpm, se separó el suero y se guardó a  $-20^{\circ}$  C para la posterior determinación de gonadotrofinas.

#### 5. Determinación de LH y FSH:

LH y FSH plasmáticas fueron determinadas por duplicado, usando la técnica de RIA de doble anticuerpo. El material para el ensayo fue provisto por el NIA-MDD Rat Pituitary Program (Bethesda). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 8 % y 10 %, respectivamente. Los resultados se expresaron en ng/ml de suero, en términos de la preparación de referencia.

#### 6. Análisis estadístico:

Los resultados fueron expresados como Media  $\pm$  Desviación Standard. El nivel de significación fue hallado por análisis de varianza (ANOVA). La diferencia de significación entre medias fue determinada con Student Newman Keulls. Las diferencias entre las medias de dos grupos experimentales fueron calculadas por Student's "t" test, considerándose significativo  $p < 0.005$ .

### RESULTADOS

#### Primera parte del experimento:

El nivel de parición y el número de crías nacidas vivas ente los grupos control y DEHP fue del 100%. La ganancia de peso corporal entre las ratas preñadas expuestas al DEHP y los controles fue similar. En la Tabla 1 se observa que no hubo diferencias significativas en el peso corporal al nacer y a través de las etapas postnatal pre y peripuberal, de las crías expuestas al DEHP respecto al grupo control. Sin embargo se halló una disminución significativa en los pesos de testículo. Cuando se observaron los caracteres sexuales secundarios se verificó un 25% de criptorquidea en el total de los machos nacidos de este primer apareo. Asimismo se detectó un retraso en apertura vaginal de las hembras tratadas con el tóxico ( $54 \pm 1$  días DEHP vs  $39 \pm 1$  días Control)

**Tabla 1.** Peso corporal y de gónadas desde el nacimiento hasta PND30 en crías expuestas al DEHP pre y postnatal (\*  $p < 0.001$ )

	$11.6 \pm 1.4$	$13.5 \pm 1.1$
	$27.3 \pm 3.6$	$32.6 \pm 2.8$
	$61.3 \pm 3.6$	$67.6 \pm 2.8$
	$132.9 \pm 11.4$	$103.6 \pm 4.7$
	$406.2 \pm 21.2$	$324.7 \pm 32.2^*$
	$27.0 \pm 2.8$	$33.5 \pm 1.8$
	$50.9 \pm 5.9$	$52.9 \pm 4.4$
	$14.6 \pm 1.5$	$14.4 \pm 1.1$
	$29.0 \pm 0.8$	$29.7 \pm 1.4$

En las figuras 1 y 2 se muestran los niveles de LH y FSH hallados en ratas hembra y macho de 30 días (PND30) que fueron expuestas al DEHP desde el día primero de la gestación (GD1), durante la lactancia y después del destete hasta el sacrificio en la etapa peripuberal. En ratas macho se observó una significativa disminución en los valores de FSH, sin modificaciones de esta gonadotropina en las hembras y en los niveles de LH en ambos sexos.

### Segunda parte del experimento:

Teniendo en cuenta las alteraciones sobre el eje reproductor detectadas en ratas macho peripúberes expuestas al DEHP intraútero y durante la maduración sexual, a otro grupo de ratas de ambos sexos con similar tratamiento al proporcionado en el primer experimento, se les continuó suministrando el disruptor hasta la edad adulta. En el momento en que fueron puestas en apareo, el agua de bebida conteniendo DEHP fue reemplazada por otra libre de él. Es de destacar que se logró una tasa de preñez de las hembras del 75% aproximadamente y que el tiempo en lograr la preñez fue más prolongado.

En las figuras 3, 4 se muestran los resultados de las determinaciones de gonadotropinas en ratas macho de 30 días (PND30) sin tratamiento, nacidas de progenitores expuestos previamente al DEHP en los períodos pre y post natal. Puede apreciarse una situación similar al primer experimento:

- A. Significativo descenso en los niveles de FSH en las crías macho de 30 días (PND30) provenientes de apareos con machos expuestos intra útero al disruptor (H-DEHP+M-DEHP vs. H-CONTROL+M-DEHP CONTROL:  $43.33 \pm 6.6$  vs.  $230.6 \pm 38.5$ ,  $p < 0.001$ ; H-CONTROL+M-DEHP vs. H-CONTROL+M-CONTROL:  $153.3 \pm 20.2$  vs.  $230.6 \pm 38.5$ ,  $p < 0.01$ ); sin detectarse cambios de FSH en las ratas macho PND30 provenientes de machos no expuestos (H-DEHP+M-CONTROL vs. H-CONTROL+M-CONTROL:  $210 \pm 20.1$  vs.  $228.5 \pm 17$ ).
- B. Ausencia de cambios en la secreción de LH (ng/ml) en todos los grupos de ratas macho PND30 (H- DEHP+M-DEHP:  $10.6 \pm 1.5$ ; H-CONTROL+M-DEHP:  $8.2 \pm 2.4$ ; H-DEHP+M-CONTROL:  $11.2 \pm 1.4$ ; H-CONTROL+M-CONTROL:  $12.1 \pm 1.5$ ).

Fig. 1

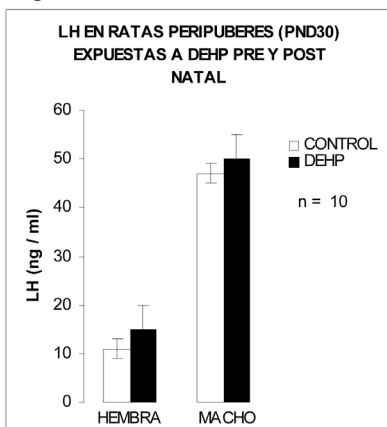


Fig. 2

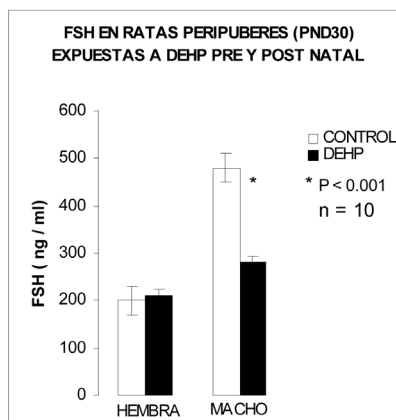


Fig. 3

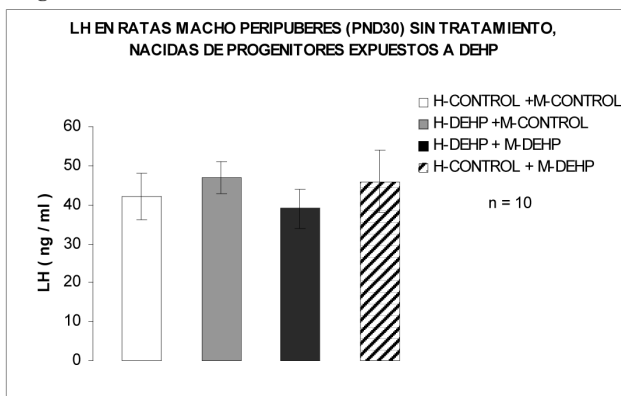
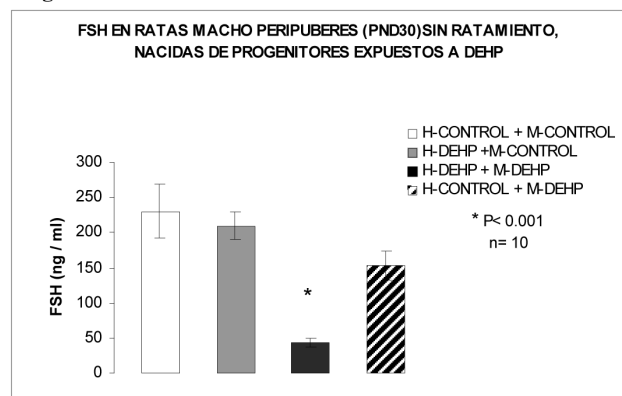


Fig. 4



Según puede verse en las figuras 5 y 6, no se detectaron modificaciones en la secreción de LH y FSH en las crías hembras PND30 provenientes de todos los grupos de apareo, en coincidencia con lo observado previamente en los animales de la misma edad que fueron expuestos al tóxico vía placenta y postnatalmente.

Por otra parte, se detectó disminución de FSH ( $p < 0.001$ ) en los progenitores machos expuestos desde su gestación al DEHP en relación a los controles (DEHP:  $270.3 \pm 33.7$  vs CONTROL:  $458.5 \pm 47.7$ ).

Si bien la progenie resultante de los distintos grupos de apareos no tuvo exposición directa al tóxico, se halló un descenso significativo del peso testicular (Fig. 7), a semejanza de lo observado anteriormente en las crías tratadas intra útero. La disminución del peso registrada en las crías macho PND30 fue: 57.5% para H-DEHP + M-DEHP y 47.3% para H-CONTROL + M-DEHP vs 47% intra útero y lactancia.

En la figura 8 se muestra la magnitud del efecto del DEHP sobre la secreción de FSH ratas macho PND30, en las diferentes condiciones de exposición al tóxico. El porcentaje de disminución en la secreción de

FSH fue: 68% para la exposición desde la vida intrauterina hasta el sacrificio vs 72% para las crías no expuestas, pero nacidas de apareos de ambos progenitores sometidos previamente al tratamiento con DEHP. Por lo tanto, el descenso producido por la exposición transgeneracional al disruptor endocrino estudiado mostró ser cuantitativamente similar al ocasionado por la exposición directa vía placenta, lactancia e ingesta.

## DISCUSIÓN

El desarrollo del sistema reproductor masculino es andrógeno dependiente y por lo tanto vulnerable a antiandrógenos. Los esteres de ftalato, entre ellos el DEHP, han mostrado tener efectos tóxicos en animales inmaduros y adultos. Su acción antiandrogénica puede alterar la homeostasis hormonal y producir efectos teratogénicos cuando la exposición comienza en períodos críticos de la diferenciación sexual.

En estudios previos<sup>(19)</sup> realizados en ratas de laboratorio, hemos demostrado que la exposición pre y post natal a DEHP, vía placenta y lactancia, produce alteraciones en el desarrollo gonadal de ratas macho y modifica los mecanismos neuroendocrinos involucrados

Fig. 5

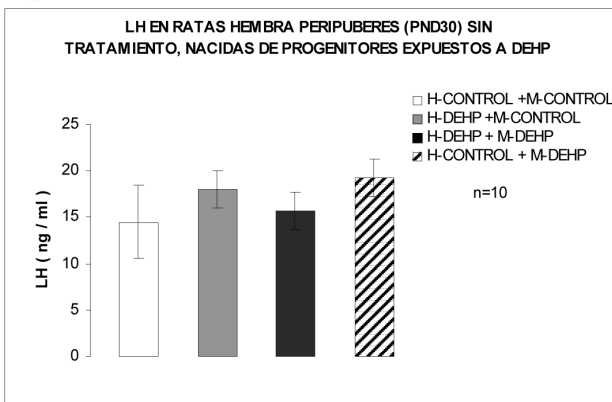


Fig. 6

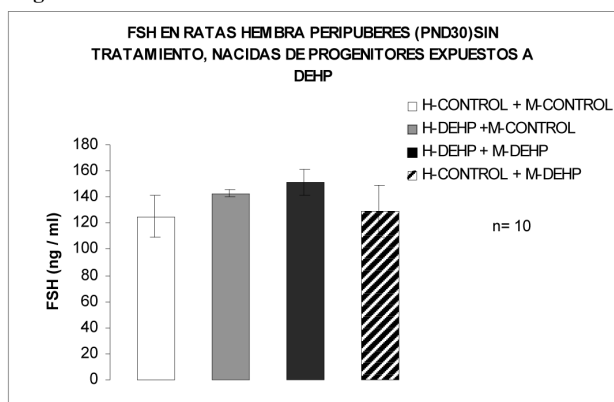


Fig. 7

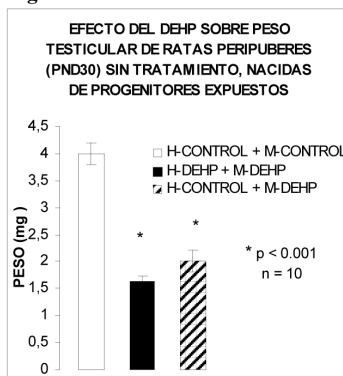
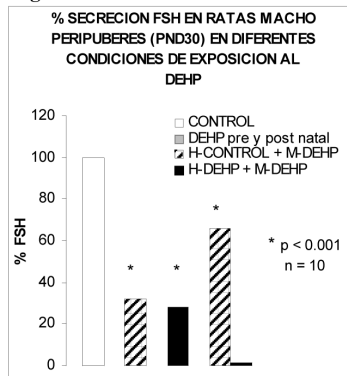


Fig. 8



en el desarrollo puberal. En estos animales, existiría una correlación entre los cambios en los niveles plasmáticos de gonadotrofinas hipofisarias y las concentraciones de neurotransmisores hipotalámicos excitatorios e inhibitorios, cuyas neuronas secretorias hacen sinapsis con las neuronas Gn-RH localizadas en el núcleo preóptico del hipotálamo medio basal.

Los hallazgos del presente trabajo confirman la existencia de modificaciones en la secreción de FSH en ratas macho inmaduras expuestas a DEHP a través del agua de bebida, en dosis equivalente a 24 ug/kg/día, suministrada desde la gestación hasta el sacrificio en la etapa peripuberal (PND30). El descenso de FSH observado, se relacionaría con el aumento del tono gabaérgico inhibitorio y la disminución del tono estimulante de los aminoácidos excitatorios, fundamentalmente aspartato, reportado previamente en condiciones experimentales semejantes<sup>(19)</sup>. No se detectaron cambios en la secreción de gonadotrofinas hipofisarias en las hembras PND30 sometidas a similar tratamiento; sin embargo se observó un retraso en la apertura vaginal, que podría relacionarse con el aumento en la concentración hipotalámica de GABA producido por DEHP<sup>(19)</sup>.

El efecto del DEHP observado en la descendencia no expuesta, de progenitores macho previamente tratados con el tóxico desde la vida intrauterina, también se reflejó en disminución de FSH en machos en la etapa de maduración sexual. La acción del DEHP fue similar cuali y cuantitativamente en ambas condiciones experimentales. Se evidenció en el porcentaje de disminución de la secreción de FSH y en el descenso del peso testicular, siendo aún más notable cuando las crías provenían del apareo de ambos progenitores tratados con el disruptor. No se encontró efecto en la descendencia no expuesta, provenientes del apareo de hembra tratada y macho sin tratamiento previo.

Se detectaron diferencias sexuales en efecto del DEHP, ya que no se observaron cambios en la secreción de gonadotrofinas en las ratas hembra en ambos esquemas de tratamiento. Estos resultados podrían explicarse por la diferente toxicidad del DHP en machos y hembras, que sería dependiente de la edad: ocurría en períodos tempranos de la diferenciación y maduración sexual masculina produciendo alteraciones en el desarrollo fetal testicular, mientras que la potencial toxicidad en el aparato reproductor femenino se manifestaría más tardíamente provocando ciclos anovulatorios, ovarios quísticos, endometriosis y abortos<sup>(14)</sup>.

Los mecanismos moleculares por los cuales el DEHP ejerce su toxicidad sobre los ejes reproductores femenino y masculino, son diferentes y aún no están completamente dilucidados.

En machos, el efecto anti-androgénico del tóxico estaría relacionado primariamente con la reducción de la producción de testosterona. Según Park y col<sup>(20)</sup> el efecto de DEHP "in utero" y la inducción de malformaciones testiculares, correlaciona con disminución en la producción de testosterona durante la diferenciación sexual, indicando que en esta etapa el tóxico ejercería su acción disruptora reduciendo el esteroide a niveles semejantes a los que presentan los fetos hembra de ratas. También se ha informado que el MEHP, principal metabolito activo del DEHP, reduce la unión de FSH a las células de Sertoli, siendo éste al menos uno de los posibles mecanismos responsables de su toxicidad testicular<sup>(21)</sup>. Recientemente, se ha sugerido que la supresión en los niveles de testosterona en ratas macho expuestas a DEHP desde el período fetal, podría deberse a una "downregulation" en la expresión de receptores nucleares y enzimas involucradas en la esteroideogénesis en las células de Leydig<sup>(22)</sup>.

En ratas hembra se ha sugerido un modelo por el cual DEHP a través de su metabolito, el MEHP, no ejercería su efecto actuando sobre receptores estrogénicos sino vía los receptores nucleares PPAR; es decir que actuaría como un inhibidor enzimático de la actividad de la aromataasa siendo capaz de suprimir la producción de estradiol en las células de la granulosa del ovario y este efecto estaría mediado por la activación de los PPAR por el DEHP<sup>(23)</sup>.

Los resultados de este estudio preliminar indican la existencia de cambios en la secreción de FSH tanto en ratas macho inmaduras expuestas al DEHP pre y post natalmente como en aquellas sin tratamiento pero provenientes de progenitores macho expuestos. Hemos aportado datos no existentes en la bibliografía respecto a la exposición transgeneracional, ya que la mayoría de los trabajos han centrado su interés en los efectos de los disruptores endocrinos a través de la exposición directa, gestacional y/o durante la lactancia, sin considerar posibles efectos acumulativos, residuales o tardíos. No obstante, son necesarios más estudios para conocer los mecanismos subyacentes que serían los causantes de su toxicidad transgeneracional a nivel gonadal.

## CONCLUSIONES

El DEHP podría alterar el eje gonadal de ratas macho inmaduras nacidas de machos expuestos al tóxico, aún sin haber tenido una exposición directa durante la gestación y lactancia. Los resultados preliminares concuerdan con la hipótesis respecto a la patogenia de distintos desórdenes causados por disruptores endocrinos, que sugiere que éstos podrían modificar la homeostasis hormonal con una expresión de efecto, que puede ser tardía o incluso transgeneracional.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Moore RW, Rudy TA, Thien-Mi Lin, Ko K, Peterson RE. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to antiandrogenic plasticizer. *Environ Health Perspect* 2001;109:229-37
2. Goldman JM, Laws SC, Balchak SK, Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine-disrupting chemicals prepuberal exposures on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. *Critical Reviews in Toxicology* 2000;30:135-96
3. Gray LE Jr, Ostby J, Furr J, Price M, Veeranachaneni DN, Parks L. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP and DINP, but not DEP, DMP or DOTP alters sexual differentiation of males rat. *Toxicol Sci* 2000;58(2):350-65
4. Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Pares I, Ruggieri F, Mazzeo P. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl phthalate) and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 2003;111:1783-5
5. Faouzi MA, Dine T, Gressier B, Kambia K, Luyckx M, Pagniez D, Brunet C, Cazin M, Belabed A, Cazin JC. Exposure of hemodialysis patients to di-2ethylhexylphthalate. *Int J Pharm* 1999;180:113-21
6. Calafat AM, Needham LL, Silva MJ, Lambert G. Exposure to di-2ethylhexylphthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 2004;113(5):429-31
7. Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-an update and latest results. *Int J Androl* 2006;29:155-65
8. Takeuchi S, Ida M, Kobayashi S, Jin K, Matsuda T, Kojima H. Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and androgen receptor. *Toxicology* 2005;210:223-33
9. Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Earl Gray L. The plasticizer Diethylhexyl Phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in male rats. *Toxicological Sciences* 2000;58:339-49
10. Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Gericke C, Grote K, Golombiewski A, Sterner-Kock A, Chahoud I. A dose response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology* 2006;228:85-97
11. Dalsenter PR, Santana GM, Grande SW, Andrade AJ. Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats. *Hum Exp Toxicol* 2006;25:297-303
12. Lovekamp-Swan TN, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 2003;111:139-45
13. Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. A dose response study following in utero and lactation exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Effects on female rat reproductive development. *Toxicol Sci* 2006;91:247-54
14. Cobellis L, Latini C, De Felice C, Raíz S, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P, Petraglia F. High plasma concentration of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod* 2003;18:1512-5
15. Calo L, Fracasso A, Cantaro S, Cozzi E, De Silvestre G, Plebani M. Plasticizers induced mononuclear interleukin 1 production: implication with peritoneal sclerosis. *Letter Clin Nephrol* 1993;40:57
16. Den Hond E, Schoeters G. Endocrine disruptors and human puberty. *International J Andrology* 2006;29:264-71
17. Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 2004;112:541-3
18. Arcadi FA, Costa C, Imperatore C, Marchese A, Repisarda A, Salemi M. Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling into de Long-Evans rats. *Food Chem Toxicol* 1998;36:963-70
19. Carbone S, Szwarcfarb B, Reynoso R, Ponzio O, Cardozo N, Moguilevsky J, Scacchi P. Exposición pre y post natal al disruptor endocrino DEHP (DI-2-ETIL-HEXILFTALATO) modifica el eje hipotálamo-hipofisotesticular en ratas macho peripúberes. *Medicina* vol 66 (Supl.II), POS 352.
20. Park JD, Habeebu, Klaussen CD. Testicular toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on spermatogenesis in adult rats. *Toxicology* 2002;171:105-15
21. Grasso P, Heindel JJ, Powell CJ, Reichert LE. Effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate, a testicular toxicant on follicle-stimulating hormone binding to membranes from cultures rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction* 1993;48:454-9
22. Borch J, Metzdorff SB, Vinggaard AM, Brokken L, Dalgaard M. Mechanisms underlying the anti-androgenic effect of diethylhexyl phthalate in fetal testis. *Toxicology* 2006;223:144-55
23. Sawn Frederiksen H, Skakkebael NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007;7:899-911

## INTRODUCCIÓN