

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Reproducción Animal



**ESTUDIO TRANSLACIONAL DE LOS EFECTOS
DEL DISRUPTOR ENDOCRINO DI(2-ETILHEXIL)
FTALTO (DEHP) SOBRE LA FUNCIÓN
REPRODUCTIVA FEMENINA EN UN MODELO
ANIMAL OVINO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Ángeles Herreros Guerra

Bajo la dirección de los doctores

Teresa Encinas Cerezo
Antonio González de Bulnes López

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-2885-6

© María Ángeles Herreros Guerra, 2009



**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Veterinaria**

**ESTUDIO TRANSLACIONAL DE LOS EFECTOS DEL
DISRUPTOR ENDOCRINO DI(2-ETILHEXIL) FTALATO
(DEHP) SOBRE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA FEMENINA
EN UN MODELO ANIMAL OVINO**

María Ángeles Herreros Guerra

Madrid, 2009

Al Dr D. Juan Herreros Mediavilla, el espíritu de la continua superación y la persona con más fuerza de voluntad que he conocido, responsable en gran medida de que haya llegado hasta aquí.

Trabajo que presenta la Licenciada en Veterinaria D^a María Ángeles Herreros Guerra para aspirar al grado de Doctor en Veterinaria.

Fdo.: María Ángeles Herreros Guerra
Madrid, septiembre de 2009

D^a Teresa Encinas Cerezo, Profesora Titular del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid y D. Antonio González de Bulnes López, Investigador Titular del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria,

CERTIFICAN:

Que la memoria que lleva por título: "*ESTUDIO TRANSLACIONAL DE LOS EFECTOS DEL DISRUPTOR ENDOCRINO DI(2-ETILHEXIL) FTALATO (DEHP) SOBRE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA FEMENINA EN UN MODELO ANIMAL OVINO*", elaborada por la Licenciada en Veterinaria D^a María Ángeles Herreros Guerra, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Madrid, septiembre de 2009

Fdo.: Teresa Encinas Cerezo Fdo.: Antonio González de Bulnes López

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto Santander/UCM PR41/06-150053.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	15
RESUMEN	17
SUMMARY	23
1.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	29
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	37
2.1. CONCEPTO DE DISRUPTOR ENDOCRINO	39
2.2. EFECTOS DE LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN	41
2.3. ESTRUCTURA QUÍMICA, TOXICOCINÉTICA Y TOXICIDAD DEL DI(2-ETILHEXIL)FTALATO (DEHP)	49
2.4. LA OVEJA COMO MODELO EXPERIMENTAL	65
3.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	83
ANIMALES	85
3.1. OBJETIVO 1. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE DEHP EN OVEJAS SIN EXPOSICIÓN EXPERIMENTAL	87
Animales y toma de datos	87
Análisis de los datos	87
Resultados	88
Discusión	89
3.2. OBJETIVO 2 ESTUDIO CINÉTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DEHP EN OVEJAS Y ESTABLECIMIENTO DEL MODELO EXPERIMENTAL	93
Animales y toma de datos	93
Análisis de los datos	94
Resultados	95
Discusión	97

3.3. OBJETIVO 3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE DEHP SOBRE LA CICLICIDAD REPRODUCTIVA, LA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL CUERPO LÚTEO Y LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA	103
Animales y toma de datos	103
Análisis de los datos	103
Resultados	104
Discusión.....	107
3.4. OBJETIVO 4. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE DEHP SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA E HIPOFISARIA EN LA FASE FOLICULAR Y LUTEAL TEMPRANA DEL CICLO SEXUAL Y SU POSIBLE RELACIÓN CON ALTERACIONES HEPÁTICAS.....	112
Animales y toma de datos	112
Análisis de los datos	113
Resultados	114
Discusión.....	118
4.- DISCUSIÓN GENERAL	125
5.- CONCLUSIONES	137
6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
ANEXO I. METODOLOGÍA	181
ANEXO II. PUBLICACIONES	191

A lo largo de este tiempo varias personas me han ayudado en la realización de las diferentes actividades o trabajos para poder llegar a la presentación de esta Tesis; por ello, no quiero dejar de agradecerles el haber estado presentes.

A la Dra. Teresa Encinas, por estar siempre dispuesta a escucharme y por sus maravillosos tes educativos y de reciclado al mundo de la toxicocinética, por la paciencia con la que satisfizo mis inquietudes y preguntas y por esas tardes de cromatógrafo.

Al Dr Antonio González de Bulnes, persona con una gran tenacidad, capacidad de trabajo, motivación y perspectiva, que se refleja en todo aquello que emprende, haciendo que todo parezca sencillo. Mil gracias por tanto tiempo y esfuerzo personal dedicados, por su apoyo incondicional y ánimos en todo momento.

Muchísimas gracias a ambos directores de tesis por la entrega e ilusión con que apoyaron mi trabajo.

A la Dra Claudia Letelier, Dr Ignacio Contreras y Dr José María Ros por su apoyo técnico y humano. Así como a la Dra Pilar Pallarés y futura Dra Laura Torres que, además de su apoyo en la realización de pruebas laboratoriales me ayudaron en la última revisión de la tesis.

A la gente de la granja, por ocuparse de las ovejas.

A la Catedrática Juana María Flores por abrirme las puertas de su laboratorio y a la Dra Rosa Ana García por su inestimable ayuda en el cuarto experimento.

A mis compañeras y amigas Silvia, Mar y Nieves por sus ánimos y ayuda.

A mi familia y amigos por su apoyo y cariño.

A las ovejas por su gran paciencia.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y al Departamento de Toxicología y Farmacología quiero agradecerles que me hayan permitido el uso de sus instalaciones para llevar a cabo la parte experimental de este trabajo.

RESUMEN

En la actualidad, existe una creciente preocupación causada por las evidencias encontradas acerca del efecto de los ftalatos, sustancias ampliamente usadas en la industria de fabricación de plásticos, como disruptores endocrinos. Concretamente, el di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) es un compuesto muy utilizado como componente de materiales plásticos (tipo policloruro de vinilo, PVC), que posee una elevada tendencia a liberarse de la matriz plástica, por lo que los animales y el hombre se encuentran muy expuestos a su acción. La presencia de ftalatos, potencialmente tóxicos, en distintos fluidos y tejidos orgánicos de origen animal y humano ha sido correlacionada en varias especies con diversas alteraciones estructurales y funcionales en el organismo. Sin embargo, existen pocos estudios que aborden su efecto sobre la función reproductiva; la mayoría de ellos investigan alteraciones inducidas en el aparato reproductor masculino de roedores, por lo que los resultados no son extrapolables a mamíferos superiores o humanos.

En este trabajo de Tesis Doctoral se aborda el diseño y utilización de un modelo experimental, basado en estudios previos en ovejas, para estudiar la toxicidad del DEHP en hembras adultas. El objetivo principal es la valoración de los efectos de la exposición a di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), durante cortos periodos de tiempo, sobre la función reproductiva femenina. Para ello, se han marcado dos fases consecutivas. En primer lugar, el diseño del modelo; mediante la valoración de los niveles espontáneos, o basales, de DEHP en individuos no expuestos experimentalmente al compuesto y la posterior evaluación de su comportamiento cinético (biodisponibilidad, distribución y eliminación) para crear un modelo de intoxicación. En segundo lugar, el estudio propiamente dicho de los efectos del DEHP sobre la actividad reproductiva en hembras adultas (función neuroendocrina y ovárica), utilizando nuestro modelo experimental.

En la primera fase, para la valoración de los niveles espontáneos, o basales, de DEHP en individuos no expuestos experimentalmente al compuesto, se muestrearon 150 ovejas de diferentes edades (2 a 7 años) y estatus reproductivo (preñadas y no preñadas) y se analizaron los niveles de DEHP en plasma mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). El 34,7% de las muestras plasmáticas mostraron presencia de DEHP, con niveles medios de $0,45 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ (rango= $0,05\text{-}2,81 \mu\text{g/ml}$). La edad del animal y la gestación tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de DEHP, ya que el porcentaje de hembras no preñadas con trazas de DEHP fue más alto en ovejas mayores de 4 años, si bien los niveles medios eran similares, y todas las ovejas preñadas ($n=15$) mostraron presencia del compuesto con niveles plasmáticos más altos que en el resto de hembras. Para confirmar los efectos de la preñez sobre los niveles de DEHP, se realizó un segundo muestreo sobre 101 ovejas de la misma edad; el porcentaje de animales con trazas de DEHP era mayor en ovejas preñadas ($n=32$; 71,9%) que en aquellas no preñadas ($n=37$; 35,1%; $P<0,005$) o que habían parido recientemente ($n=32$; 21,9%; $P<0,005$). Así, estos resultados indican una alta incidencia, de exposición a DEHP en ovejas criadas en el campo; el porcentaje de animales con presencia de DEHP se incrementa con la edad, posiblemente por un mayor periodo de exposición, y durante la gestación, probablemente debido a la movilización de las reservas corporales.

En un estudio posterior, se abordó el comportamiento cinético del DEHP mediante la administración de dosis únicas del ftalato por vía intravenosa e intramuscular y, posteriormente, tras la administración de protocolos de dosis múltiples. Para ello, 24 ovejas adultas fueron divididas en tres experimentos consecutivos. En el primero y segundo se administraron dosis únicas de DEHP (25 mg/kg de peso vivo) por vía intravenosa e intramuscular, respectivamente. En el tercer experimento, se llevó a cabo la administración de dosis múltiples de DEHP, tres veces por semana durante cuatro meses (25 mg/kg durante dos meses y 50 mg/kg los dos meses siguientes). El estudio cinético mostró que una única dosis intravenosa inducía niveles superiores a los basales ($0,18 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$) durante periodos entre 20 y 43 días; el aclaramiento fue $12,6 \pm 3,8 \text{ ml/min/kg}$, el volumen de distribución fue $31,4 \pm 8,7$

l/kg y el tiempo medio de residencia fue $87,5 \pm 26,2$ horas. La administración de dosis únicas intramusculares mostró una buena absorción ($C_{max} = 1,34 \pm 0,45$ $\mu\text{g/ml}$; $t_{max} = 15,0 \pm 2,2$ min y $F = 78,96$ %). Los regímenes de dosis múltiples dieron lugar a concentraciones plasmáticas crecientes que alcanzaron niveles estables en la tercera semana y que se mantuvieron en medias de $0,29 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$ (25 mg/kg) y $0,38 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$ (50 mg/kg). Estos incrementos en los niveles plasmáticos de DEHP estarían cercanos a los descritos por exposición medioambiental, por lo que este régimen de administraciones seriadas se considera un buen modelo para valorar la toxicología reproductiva del DEHP en concentraciones similares a las alcanzadas por exposición no experimental.

En la segunda parte de este trabajo experimental se realizó el estudio de los efectos de DEHP sobre la actividad ovulatoria cíclica, y el patrón de crecimiento morfológico y la actividad secretora de los cuerpos lúteos, en hembras ovinas adultas. Un total de 16 ovejas adultas fueron expuestas durante dos meses, mediante la administración del protocolo diseñado en el estudio anterior, a dosis de 25 (grupo DEHP25; n=8) y 50 mg/kg peso vivo de DEHP (grupo DEHP50; n=8); seis hembras fueron utilizadas como controles (grupo CTL). Los efectos de la exposición a DEHP fueron valorados mediante seguimientos morfométricos (caracterización ultrasonográfica de los cuerpos lúteos) y funcionales (concentraciones plasmáticas de progesterona) de la actividad reproductiva cíclica en estos animales. La administración de DEHP afectó, en forma dosis-dependiente, a la longitud de los ciclos ováricos ($P < 0,05$), que presentaron duraciones medias de $17,1 \pm 0,5$ días en el grupo CTL, $15,1 \pm 0,9$ días en el grupo DEHP25 y $12,0 \pm 0,8$ días en el grupo DEHP50. Un 94,9% de los ciclos fueron normales en duración en el grupo CTL, pero sólo el 51,1% y el 25,4% en los grupos DEHP25 y DEHP50, respectivamente. El tamaño del tejido luteal fue, asimismo, afectado por la administración de diferentes dosis de DEHP; los cuerpos lúteos fueron más pequeños en DEHP50 que en DEHP25 ($P < 0,05$), y en ambos grupos que en el CTL ($P < 0,005$). Sin embargo, las concentraciones plasmáticas medias de progesterona fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en los grupos DEHP que en las ovejas control. Estos resultados

muestran que la exposición a DEHP causa, en nuestro modelo, la aparición de ciclos cortos con cuerpos lúteos menores en tamaño y en duración; los altos niveles de progesterona, incompatibles con las características morfológicas de los cuerpos lúteos, podrían ser consecuencia de alteraciones metabólicas.

Un cuarto experimento tuvo como objetivo determinar los mecanismos causales de estas alteraciones en la ciclicidad ovárica. Para ello, se llevó a cabo el seguimiento de los patrones de crecimiento mediante ecografía y el estudio hormonal de la funcionalidad de los folículos preovulatorios (estradiol) y cuerpos lúteos resultantes (progesterona) y de la funcionalidad hipofisaria (LH), en 8 hembras control (grupo CTL) y en 8 ovejas adultas tratadas con dosis de 50 mg/kg peso vivo de DEHP (grupo DEHP), tres veces por semana durante dos meses. Posteriormente, se llevó a cabo la sincronización de celos y ovulaciones mediante la administración de un protocolo combinado de progestágenos y prostaglandinas. Una vez retirado el progestágeno, se realizó el seguimiento morfométrico (por ultrasonografía) y funcional (concentraciones de estradiol en plasma) de los folículos preovulatorios, se determinó la aparición de celo y la posterior ovulación y se valoró el crecimiento (por ultrasonografía) y la funcionalidad de los cuerpos lúteos (progesterona en plasma); en el día 5 del ciclo inducido, se llevó a cabo un muestreo seriado de sangre para determinar la funcionalidad hipofisaria mediante el estudio de los niveles basales y la pulsatilidad en la secreción de LH y se obtuvieron los ovarios para su valoración histológica. El estudio ultrasonográfico no mostró diferencias en los patrones de crecimiento y los tamaños de folículos preovulatorios y cuerpos lúteos; asimismo, no se apreciaron diferencias en el estudio histológico de los cuerpos lúteos. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre grupos en los niveles plasmáticos de estradiol en el momento del celo ($9,6 \pm 0,5$ pg/ml en CTL y $20,4 \pm 1,6$ pg/ml en DEHP; $P < 0,01$) y de progesterona en el día 5 ($2,8 \pm 0,2$ ng/ml en CTL y $5,8 \pm 0,3$ pg/ml en DEHP; $P < 0,05$). Por último, la valoración de la secreción de LH mostró, en el grupo DEHP, niveles basales más bajos ($0,7 \pm 0,1$ ng/ml en CTL y $0,3 \pm 0,1$ ng/ml en DEHP; $P < 0,05$) y alteraciones en la pulsatilidad. Estas alteraciones en la secreción de LH en el grupo DEHP podrían corresponderse

con los mayores niveles de progesterona encontrados en el plasma de estas hembras. Por otro lado, los altos niveles de estradiol y progesterona, y la ausencia de diferencias morfológicas en folículos y cuerpos lúteos, encontrados en animales tratados con DEHP sugieren, en coincidencia con el experimento anterior, la existencia de alteraciones en el metabolismo de los esteroides en estas hembras. Para corroborar o descartar esta hipótesis, se llevó a cabo el estudio anatomopatológico de los hígados. En los animales tratados con DEHP se observaron extensas áreas de infiltrado inflamatorio, degeneración grasa y necrosis; lesiones que son causa de disfunción hepática.

El análisis conjunto de los estudios anteriores muestra que la exposición a DEHP, utilizando como modelo ovejas adultas, se relaciona con alteraciones en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, presuntamente producidas por alteraciones en el metabolismo de los esteroides, incompatibles con una adecuada actividad reproductiva.

SUMMARY

There are, currently, increasing concerns about evidences found on the effects of phthalates, materials widely used in plastic industries, as endocrine disruptors. Specifically, the di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), used for producing polyvinyl chloride (PVC); DEHP has a high propensity for releasing from plastic, so animals and human beings are very exposed to its action. The presence of phthalates, potentially toxic, in different fluids and tissues of animal and human origin has been related to different structural and functional alterations. However, there are very few studies of its effect on reproductive function; most of them have been developed in males of rodents, so results are difficultly translational to large mammals or human beings.

Current Doctoral Thesis affords the design and use of an experimental model, based in previous work in sheep, for the development of studies of kinetics and dynamics of DEHP in adult females. The main objective is the evaluation of the effects of the exposure to DEHP, during short periods of time, on the female reproductive function. Therefore, there were two consecutive phases. Firstly, the design of the model by the evaluation of DEHP levels in unexposed individuals and, later, the evaluation of the kinetics (bioavailability, distribution and elimination) for establishing a model of intoxication. Second, the proper study on the effects of DEHP on reproductive activity of adult females (neuroendocrine and ovarian function) using our experimental model.

In the first stage, for evaluation of spontaneous, or basal, levels of DEHP in unexposed individuals, we bled 150 sheep of different ages (2-7 years-old) and reproductive status (pregnant and non-pregnant) and analyzed plasma DEHP levels by high-performance liquid chromatography (HPLC). A 34.7% of the samples evidenced presence of DEHP, with mean levels of 0.45 ± 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (range= 0.05-2.81 $\mu\text{g/ml}$). DEHP levels were significantly affected by age and pregnancy. The percentage of non pregnant ewes showing DEHP traces was higher in animals older

than 4 years-old, although mean values were similar. On the other hand, all the pregnant sheep (n=15) showed presence of the compound, with higher values in plasma than non-pregnant animals. For confirming the effects of gestation on DEHP levels, we performed a second sampling over 101 ewes having the same age; the percentage of animals with DEHP traces was higher in pregnant sheep (n=32; 71.9%) than in non-pregnant (n=37; 35.1%; $P < 0.005$) or in those that recently gave birth (n=32; 21.9%; $P < 0.005$). Thus, these results indicate a high incidence of exposure to DEHP, in sheep reared in the field; the percentage of animals with presence of DEHP in blood increases with age, possibly due to longer exposition period, and during pregnancy, possibly due to the mobilization of body reserves.

In a second study, we determined DEHP kinetics by the administration of single doses of the phthalate by intravenous and intramuscular routes and, later, by the administration of multiple doses. Thus, 24 adult sheep were randomly divided in three consecutive experiments. In the first and second, single doses of DEHP were administered intravenously and intramuscularly, respectively. In the third experiment, multiple doses of DEHP were administered, three times per week, for four months (25 mg/kg for two months and 50 mg/kg the following two months). The kinetic study showed that a single intravenous dose induced levels higher than basal values ($0.18 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$) for periods between 20 and 43 days; clearance was $12.6 \pm 3.8 \text{ ml/min/kg}$, distribution volume was $31.4 \pm 8.7 \text{ l/kg}$ and mean residence time was $87.5 \pm 26.2 \text{ hours}$. The administration of single intramuscular doses showed a good absorbance ($C_{\text{max}} = 1.34 \pm 0.45 \mu\text{g/ml}$; $t_{\text{max}} = 15.0 \pm 2.2 \text{ min}$ y $F = 78.96 \%$). Multiple dose regimes induced increasing plasma concentrations that reached steady levels at the third week and that remained in means levels of $0.29 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ (25 mg/kg) and $0.38 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$ (50 mg/kg). These increments in DEHP plasma levels would be similar to those described by environmental exposure, so this regimen of serial administration would be a good model for evaluating the reproductive toxicology of DEHP.

In the second stage of current experimental work, we studied the effects of DEHP

on cyclic ovulatory activity and the patterns of growth and secretory activity of the corpora lutea in adult sheep. A total of 16 ewes were exposed, by using the protocol described above, to doses of 25 (group DEHP25; n=8) y 50 mg/kg live weight of DEHP (group DEHP50; n=8); six females were used as unexposed controls (group CTL). The effects of DEHP exposure were evaluated, for two months, by morphometric (ultrasonographic characterization of corpora lutea) and functional screening (plasma concentrations of progesterone) of the cyclic reproductive activity of these animals. The administration of DEHP had a dose-dependant effect on the length of ovarian cycles ($P<0.05$) which had a mean duration of 17.1 ± 0.5 days in the group CTL, 15.1 ± 0.9 days in the group DEHP25 and 12.0 ± 0.8 days in the group DEHP50. A 94.9% of the cycles were regular in length in the group CTL, but only a 51.1% and a 25.4% in groups DEHP25 and DEHP50, respectively. The size of luteal tissue was also affected by the administration of different doses of DEHP; the corpora lutea were smaller in DEHP50 than in DEHP25 ($P<0.05$), and in both groups than in CTL ($P<0.005$). However, mean plasma progesterone concentration were significantly higher ($P<0.05$) in DEHP than in control sheep. These results show that DEHP exposure causes, in our model, the appearance of short cycles with corpora lutea smaller in size and duration; the high levels of progesterone, incompatibles with morphological characteristics of corpora lutea, may be a consequence of metabolic alterations.

A fourth experiment aimed to determine the mechanisms causing these alterations in the ovarian cyclicity. Thus, we performed the screening of the patterns of growth and the functionality of preovulatory follicles, subsequent corpora lutea and pituitary, in 6 control sheep (group CTL) and 8 ewes treated with 50 mg/kg of DEHP (group DEHP), three times per week for two months. After these two months of exposure, oestrus and ovulation were synchronized with progestagens and prostaglandins. After progestagen removal, we performed the morphometric (by ultrasonography) and functional (plasma oestradiol levels) screening of the preovulatory follicles, determined the appearance of oestrus and the ovulation and evaluated the growth (by ultrasonography) and functionality (plasma progesterone

levels) of the corpora lutea. At Day 5 of the cycle, we carried out a serial bleeding for determining pituitary function by studying basal levels and pulsatility of LH and recovered the ovaries and hepatic tissue for histological evaluation. The ultrasonographic study did not show differences in the patterns of growth of follicles and corpora lutea; furthermore, there were no differences in the histological study of corpora lutea. However, there were significant differences between groups in the plasma levels of oestradiol at onset of oestrus behaviour (9.6 ± 0.5 pg/ml in CTL y 20.4 ± 1.6 pg/ml in DEHP; $P < 0.01$) and of progesterone at day 5 (2.8 ± 0.2 ng/ml in CTL y 5.8 ± 0.3 pg/ml in DEHP; $P < 0.05$). Finally, the evaluation of LH secretion showed, in the group DEHP, lower basal levels (0.7 ± 0.1 ng/ml in CTL y 0.3 ± 0.1 ng/ml in DEHP; $P < 0.05$). These alterations in LH secretion may be related to higher progesterone levels found in these females. Furthermore, the high levels of oestradiol and progesterone, and the absence of morphological differences in follicles and corpora lutea, found in animals treated with DEHP suggest, coincidentally with the previous study, the existence of alterations in the metabolism of steroids. Thus, we performed the study of the liver samples; animals treated with DEHP showed the presence of inflammatory cells infiltration (mainly lymphocytes), fat degeneration and necrosis; causes, all of them, of hepatic dysfunction.

Thus, the combined analysis of these studies show that the exposure to DEHP, using adult sheep as a model, is related to alterations in the functionality of the hypothalamus-hypophysis-ovary axis, presumptively by alterations in steroids metabolism, incompatible with an adequate reproductive activity.

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad, existe una creciente preocupación por el efecto de algunos contaminantes químicos medioambientales, denominados Contaminantes Disruptores Endocrinos (EDCs, por su acrónimo en inglés), sobre la función reproductiva de mamíferos y otros organismos vivos. La lista de EDCs es un grupo heterogéneo de xenobióticos que incluye pesticidas (ej.: organoclorados, organofosforados y carbamatos), sustancias industriales (ej.: alquilfenoles, bifenilos, ftalatos, parabenos y bisfenol A), derivados de procesos industriales (ej.: dioxinas y furanos), algunos metales (ej.: arsénico y cadmio) y compuestos naturales (ej.: fitoestrógenos y micotoxinas). Sin embargo, cada día se descubren propiedades disruptoras en nuevos compuestos, que se ven añadidos a esta lista.

Entre ellos, merece especial atención, por la controversia que suscita, el plastificante di(2-etil-hexil)ftalato (DEHP, por su acrónimo en inglés). El DEHP es usado mayoritariamente para producir policloruro de vinilo (PVC) y, por ello, puede ser encontrado en todo tipo de objetos fabricados con este compuesto, incluyendo envases alimentarios, material médico y juguetes. El DEHP es un compuesto lipofílico, que no se combina químicamente con el PVC. Así, el DEHP puede liberarse del plástico al medioambiente, apareciendo en el polvo que rodea a los objetos e incluso en los alimentos o agua de bebida. Por ello, la exposición a DEHP es prácticamente constante y los ftalatos son reconocidos como los mayores contaminantes domésticos; siendo especialmente importante, en toda la población, la exposición alimentaria o por cosméticos, en niños pequeños por juguetes u objetos plásticos y en pacientes sometidos a fluidoterapia o diálisis por contacto con el material médico.

El DEHP, a pesar de un intenso debate, se considera un EDC con efectos tóxicos sobre diferentes procesos de la reproducción y desarrollo. La mayoría de los estudios de los efectos del DEHP en humanos y otros mamíferos han sido llevados a cabo en machos; debido a dificultades éticas y prácticas para la evaluación de la fecundidad femenina. Sin embargo, la exposición de mujeres a plastificantes fue

asociada, hace casi 35 años, con un descenso en la tasa de gestaciones y un aumento en la incidencia de abortos espontáneos. Los únicos estudios experimentales, hasta el momento, para la valoración de la toxicidad del DEHP sobre la reproducción femenina han sido realizados en roedores, principalmente con exposiciones a largo plazo y/o altas dosis durante periodos críticos (fetal y prepúber); recientemente, han aparecido algunas publicaciones sobre la actividad reproductiva de roedores adultos.

Por ello, el principal objetivo experimental de esta Memoria de Tesis Doctoral fue la determinación del efecto de la exposición a DEHP, durante cortos periodos de tiempo, sobre la actividad reproductiva de hembras púberes.

En este estudio se ha utilizado, como modelo animal, la oveja. Actualmente, la oveja es considerada el modelo óptimo para estudios reproductivos translacionales, debido a las estrechas similitudes con la mujer en muchos aspectos de la fisiología reproductiva, incluyendo el control de la tasa ovulatoria en cada ciclo. Por otra parte, el seguimiento de la función ovárica, mediante ultrasonografía y valoración de hormonas en muestras de sangre, es una técnica bien establecida en esta especie. Finalmente, el tamaño corporal y el temperamento de estos animales, a diferencia de los roedores, permite repeticiones seriadas de muestreos cada pocos días o incluso diariamente, en periodos más cortos.

Para la consecución del objetivo citado, se plantearon como imprescindibles dos objetivos previos. El *primer objetivo* fue la *valoración de los niveles espontáneos, o basales, de DEHP en individuos no expuestos experimentalmente al compuesto*; es decir, los niveles en ovejas en condiciones de campo por exposición al compuesto en comida, bebida o medioambiente. En este estudio se abordó la importancia de variables dependientes del animal; en concreto, raza, edad y estatus reproductivo. El *segundo objetivo*, necesario para la validación de nuestro modelo experimental, fue la *determinación de los parámetros cinéticos de la exposición por administración de DEHP por distintas vías y diferentes protocolos y dosis*.

Una vez establecido nuestro modelo experimental y el protocolo de administración de DEHP adecuado para la obtención de niveles plasmáticos representativos de las concentraciones encontradas en individuos expuestos, se abordó el *tercer objetivo* de este trabajo experimental, la *evaluación de posibles efectos del ftalato sobre la actividad ovulatoria cíclica y las características morfométricas y funcionales del cuerpo lúteo*, como indicadores de la aptitud reproductiva femenina.

Los resultados obtenidos en el desarrollo experimental de este tercer objetivo dieron lugar al desarrollo del *cuarto objetivo* de esta Tesis, el *estudio del efecto de la exposición a DEHP sobre la función hipofisaria y ovárica durante la fases folicular y luteal temprana del ciclo*, para, así, determinar el efecto de este compuesto sobre los patrones de crecimiento y la funcionalidad de los folículos preovulatorios y de los posteriores procesos tempranos de luteogénesis y actividad progesteronémica de los cuerpos lúteos y su regulación mediante la secreción pulsátil de LH.

Finalmente, para dilucidar las posibles causas de la falta de coincidencia, en el tercer y cuarto objetivos, entre las características morfológicas de folículos preovulatorios y cuerpos lúteos y las variables indicadoras de su actividad endocrina (concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona), se llevó a cabo el *estudio de alteraciones hepáticas como posible causa de variaciones en la función reproductiva producidas por la exposición a DEHP*.

En resumen, el objetivo experimental general de la presente Memoria de Tesis Doctoral fue la determinación del efecto de la exposición a DEHP, durante cortos periodos de tiempo, sobre la actividad reproductiva femenina. Para ello se abordaron como objetivos específicos:

1. Valoración de los niveles espontáneos, o basales, de DEHP en individuos no expuestos experimentalmente al compuesto.

2. Determinación de los parámetros cinéticos tras administración de DEHP por distintas vías y diferentes protocolos y dosis y, así, establecer los regímenes posológicos adecuados para simular los niveles de exposición medioambiental.
3. Evaluación del efecto de la exposición a DEHP sobre la actividad ovulatoria cíclica y las características morfométricas y funcionales del cuerpo lúteo.
4. Estudio del efecto de la exposición a DEHP sobre la función hipofisaria y ovárica durante las fases folicular y luteal temprana del ciclo, y su posible relación con alteraciones hepáticas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONCEPTO DE DISRUPTOR ENDOCRINO

El término *disruptor endocrino* se utiliza para denominar diferentes agentes exógenos que producen efectos adversos sobre la salud de organismos vivos o su progenie, ya que interfieren la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, acción y/o eliminación de las hormonas endógenas (Kavlock y Ankley, 1996). Por ello, afectan principalmente a la actividad de los sistemas reproductivo, neurológico e inmunológico.

El conjunto de sustancias con actividad disruptora conocida, aunque la lista sigue en aumento, puede clasificarse en:

- Plaguicidas, como organoclorados (DDT, dieldrín), organofosforados y carbamatos.
- Subproductos de procesos industriales, como dioxinas y furanos.
- Sustancias de uso industrial, como alquilfenoles, bifenilos policlorados (PCBs), bisfenoles, ftalatos.
- Metales, como arsénico y cadmio.
- Sustancias naturales, como fitoestrógenos y aflatoxinas.

Esta gran variedad de productos, y la abundancia de entornos y procesos en que se utilizan (papel, envases alimentarios, tejidos, jabones y detergentes, pinturas, cosméticos, tapicerías, terminaciones de suelos, pegamentos, tintes, materiales médicos, etc.), facilita el contacto continuo entre ellos y los seres vivos. Además, la mayoría de estos compuestos presentan una gran persistencia en el medio ambiente (principalmente PCBs, dioxinas, furanos, mercurio y algunos pesticidas) y una gran movilidad medioambiental; lo que implica que la exposición puede alargarse en el tiempo y en el espacio respecto al momento y el lugar en que fueron liberados (Loganathan y Kannan, 1994).

Por otro lado, la mayoría de estas sustancias presentan baja solubilidad en agua y alta liposolubilidad, lo que provoca su bioacumulación en tejido graso y su

biomagnificación a través de la cadena alimenticia. Por ello, su efecto es aún más preocupante en las especies que se encuentran en los niveles elevados de esta cadena (Shaw, 1986; Mossner y Ballschmiter, 1997)

El mecanismo disruptor de estas sustancias puede basarse en el aumento, la disminución o el bloqueo de la actividad endocrina (Sonnenschein y Soto, 1998); estas acciones se deben a la capacidad de los disruptores para mimetizar o antagonizar la acción de las hormonas endógenas, alterar su patrón de síntesis y metabolismo o modular los niveles de los receptores correspondientes.

Esta revisión bibliográfica, dado el objetivo de la presente Memoria Experimental, se centra en los efectos que los disruptores endocrinos pueden producir a nivel reproductivo y, más específicamente, en la reproducción femenina.

2.2. EFECTOS DE LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN

El estudio de los efectos de los disruptores endocrinos sobre la salud humana y animal está especialmente condicionado por consideraciones éticas, que impiden o minimizan los estudios de exposición intencionada, y técnicas, debido a la gran cantidad de sustancias implicadas y la complejidad, número e importancia de las funciones reguladas por el sistema endocrino.

Los estudios realizados se podrían clasificar, en función de las especies animales y del tipo de trabajo de investigación realizado, en:

- Efectos observados en animales silvestres.
- Efectos observados en personas.
- Trabajos experimentales con animales de laboratorio o cultivos celulares.
- Estudios epidemiológicos.

2.2.1. Efectos reproductivos observados en animales

La observación de diferentes mamíferos, reptiles, aves y peces en libertad y la realización de estudios de laboratorio con roedores, primates y cultivos celulares han permitido establecer una relación entre la exposición a contaminantes endocrinos y la aparición de efectos sobre la salud reproductiva. Entre los principales efectos destacan:

- Malformaciones en oviducto, útero y cérvix.
- Ausencia o alteraciones del descenso testicular.
- Masculinización de hembras.
- Feminización de machos.
- Alteración del comportamiento sexual.
- Niveles hormonales anormales.
- Reducción de la fertilidad.

- Inducción de procesos cancerosos en órganos reproductores femeninos y masculinos.
- Modificación del sistema inmunológico.

La mayoría de estos efectos se hacen evidentes en individuos adultos, aunque la exposición de los individuos a los disruptores endocrinos se produzca durante la etapa de desarrollo embrionario.

Las primeras evidencias sobre actividad disruptora endocrina de compuestos químicos surgieron en Estados Unidos a finales de la década de 1960; la constatación de una drástica disminución de la población de pájaros se relacionó con graves problemas reproductivos causados por los pesticidas organoclorados diclorodifeniltricloroetano y diclorodifenildicloroetileno (DDT y DDE; Hickey y Anderson, 1968; Heath, 1969; Heath y col., 1969).

En 1980, en Florida, se produjo la exposición de caimanes al pesticida dicofol (Keltano), como consecuencia de un vertido accidental. Diez años más tarde, la población de estos animales había descendido significativamente, debido a una mayor mortalidad tanto de embriones en huevos no eclosionados como de las crías menores de diez días de edad. Además, se encontraron hembras prepúberes con anomalías severas en los ovarios y machos jóvenes fuertemente feminizados con aparatos reproductores anormalmente pequeños; en ambos sexos, los niveles de estrógenos en sangre eran más altos de lo normal. Las investigaciones concluyeron que el producto vertido al lago había alterado el sistema endocrino de los embriones, aumentando la mortalidad embrionaria y perinatal y originando las malformaciones descritas; lo que disminuyó la capacidad de los caimanes para reproducirse (Guillette y col., 1994; Lind y col., 2004).

En 1993, en Inglaterra, se detectaron desórdenes de expresión del fenotipo sexual en peces capturados en las cercanías de plantas de tratamiento de aguas residuales; los machos presentaban características sexuales tanto masculinas como femeninas.

En este caso las sustancias químicas identificadas como responsables de estos efectos feminizantes fueron alquilfenoles, que se utilizan para la elaboración de detergentes y plásticos (Jobling y Sumpter, 1993). Poco después, en 1996, en España, en la costa de Galicia, se llevaron a cabo estudios sobre contaminación con derivados del TBT (*tributilo de estaño*, compuesto organoestañoso lixiviado de las pinturas antialgas). La especie bioindicadora elegida fue el caracol púrpura (*Nucella lapillos*) y, en todas las muestras estudiadas, se registró la presencia de individuos con *imposex* (Barreiro y col., 1998, 1999; Quintela, 2002); efecto consistente en la aparición de caracteres sexuales masculinos en las hembras, ya descrito en la década de 1980 (Gibbs y Bryan, 1986; Bryan y col., 1987).

Durante la década de 1990, la aparición de nuevas evidencias sobre los efectos disruptores de distintas sustancias químicas ha sido prácticamente continua; numerosos estudios asociaron diferentes patologías observadas en distintas especies animales con la exposición a diversos contaminantes medioambientales con actividad hormonal (Colborn y col., 1993; Colborn y Smolen, 1996; Short y Colborn, 1999). Entre los principales efectos evidenciados figuran:

- Feminización de machos en peces, aves, reptiles y mamíferos.
- Masculinización de hembras en peces, gasterópodos y aves.
- Disminución de la fertilidad en aves, peces, moluscos y mamíferos.
- Alteraciones en la incubación en peces, aves y tortugas.
- Alteraciones del sistema inmune en aves y mamíferos.
- Alteraciones de la función tiroidea en aves y peces.

Experimentalmente, en animales de laboratorio y granja, se han intentado reproducir los efectos observados en la vida silvestre, con el fin de encontrar y explicar las posibles causas a las diferentes alteraciones reproductivas (NPT-CERHR, 2006; Crain y col., 2008; European Communities, 2008). En el caso concreto de los trabajos encaminados al estudio de posibles alteraciones en la función reproductiva femenina, destaca el hallazgo de:

- Alteraciones en la secreción hipotalámica de LH y en la ovulación por exposición a bisfenol A (Rubin y col., 2006).
- Fallos en la ciclicidad reproductiva por exposición fetal o perinatal de ratones o ratas a bisfenol A, zearalenona, genisteína o resveratrol (Rubin y col., 2001; Markey y col., 2003; Nikaido y col., 2004; Jefferson y col., 2005).
- Aparición de folículos multioocíticos en rata y ratón por exposición neonatal a dietilestilbestrol (DES; Iguchi, 1985; Iguchi y Takasugi, 1986; Suzuki y col., 2002; Kirigaya y col., 2006), genisteína (Nagao y col., 2001; Jefferson y col., 2002; Jefferson y col., 2007) y bisfenol A (Suzuki y col., 2002).
- Alteraciones en la maduración del oocito y en su desarrollo embrionario posterior por alteraciones cromosómicas que tienen lugar durante la meiosis y que originan muerte del oocito u oocitos o embriones aneuploides. Este efecto ha sido descrito en exposiciones de ratonas a DES (Can y Semiz, 2000) y metales pesados (cadmio; Watanabe y col., 1979; Pisa y col., 1990), en estudios *in vitro* en bovino y porcino con exposición a zearalanona (Minervini y col., 2001; Alm y col., 2002, 2006), en ratonas adultas por exposición tanto *in vivo* como *in vitro* a bisfenol A (Hunt y col., 2003; Can y col., 2005; Susiarjo y col., 2007) y en estudios *in vitro* en vacuno, con exposición a pesticidas como DDT, lindano y metoxiclor (Alm y col., 1998).
- Deficiencias en la implantación embrionaria y posterior placentación por alteraciones en la invasión trofoblástica del endometrio, abortos e incremento de la mortalidad neonatal en ratonas expuestas a bisfenol A durante los estadios tempranos de la gestación (Tachibana y col., 2007).
- Endometriosis en roedores y primates, por exposición tanto de fetos como de adultos a diferentes organoclorados; principalmente, dioxinas como TCDD (Rier y col., 1993; Cummings y col., 1999; Yang y col., 2000), pesticidas como metoxiclor y DDT, y bifenilos policlorados (PCBs, Birnbaum y Cummings, 2002).

- Aparición de neoplasias en órganos reproductores; principalmente, cáncer de mama relacionado con exposiciones a DES (Boylan y Calhoon, 1981), a bisfenol A (Markey y col., 2001; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Murray y col., 2007) o artrazina (Stevens y col., 1994). Exposiciones pre- o neonatales a disruptores, como el DES o algunos pesticidas organoclorados, pueden incrementar la incidencia de fibromas uterinos (leiomiomas) en ratas o ratones (Newbold y col., 2002; Cook y col., 2005, 2007).

2.2.2. Efectos reproductivos observados en humanos

El ejemplo por excelencia de disrupción endocrina en humana, por su impacto, fue la exposición intrauterina, en los años 50, a dietilestilbestrol (DES) en hijas de mujeres tratadas con dicho fármaco. Varios estudios señalaron que las mujeres que fueron expuestas a DES durante la gestación presentaban abortos espontáneos, partos prematuros y partos ectópicos. Además, sus hijas presentaron una alta tasa de malformaciones en útero y cérvix (Jefferies y col., 1984; Palmer y col., 2001; Missmer y col., 2004) y mayor incidencia en cánceres de vagina, cérvix, ovario y mama (Giusti y col., 1995; Schrafer y Potter, 2004; Palmer y col., 2006).

Las sustancias disruptoras endocrinas se han relacionado posteriormente con gran número de alteraciones reproductivas, tanto en hombres como mujeres. En el caso de la mujer, entre las más destacadas, pueden citarse:

- Retraso en la aparición de la pubertad por exposición a plomo (Selevan y col., 2003; Wu y col., 2003; Denham y col., 2005).
- Adelanto de la menarquia por exposición a bifenilos (Blank y col., 2002).
- Alargamiento del ciclo sexual por exposición a dioxinas (Esquenazi y col., 2002; Chao y col., 2007) y PCBs (Cooper y col., 2005).
- Acortamiento del ciclo sexual por exposición a DDT (Windham y col., 2005).
- Incremento del tiempo necesario para conseguir la gestación y aumento del riesgo de aborto espontáneo por exposición a pesticidas y PCBs (Leoni y

col., 1989; Arbuckle y col., 1999; Curtis y col., 1999; Axmon y col., 2004; Law y col., 2005).

- Problemas en la implantación embrionaria por exposición a metoxiclor o DES, por reducción de la proliferación e incremento de la apoptosis de las células del trofoblasto (Derfoul y col., 2003; Richard y col., 2005).
- Adelanto de la menopausia por exposición a dioxinas (Esquenazi y col., 2005).
- Incremento del riesgo de endometriosis por exposición a PCBs (Gerhard y Runnebaum, 1992; Louis y col., 2005), dioxinas (Mayani y col., 1997; Esquenazi y col., 2002), DES (Missmer y col., 2004) y ftalatos (Cobellis y col., 2003; Reddy y col., 2006).
- Aparición de neoplasias; principalmente cánceres de mama, vinculados a exposición a DDT (Cohn y col., 2007), y fibromas uterinos, relacionados con exposiciones a DES (leiomiomas; Baird y Newbold, 2005).

Los efectos descritos demuestran la importancia de la exposición a disruptores endocrinos sobre la aparición de efectos deletéreos sobre la actividad reproductiva y la fertilidad femeninas. Sin embargo, su estudio se ve dificultado porque existen importantes componentes individuales y temporales que modulan los efectos derivados de esta exposición.

En primer lugar, la exposición a los compuestos químicos con actividad hormonal depende de la vulnerabilidad individual y de la dosis y duración de la exposición.

En segundo lugar, es de gran importancia el momento o periodo de desarrollo en que se encuentra el individuo cuando se produce la exposición; así, las etapas embrionaria, fetal y la primera infancia destacan como momentos críticos. Estos periodos de desarrollo, caracterizados por una alta proliferación celular y abundancia de cambios metabólicos, se conocen como *ventanas críticas* (Calabrese, 1986).

Algunos autores (Ben-Shlomo y Kuh, 2002), han señalado la necesidad de distinguir entre ventanas *críticas* y periodos *sensibles o susceptibles*, ya que exposiciones más tardías también pueden dar lugar a efectos adversos; aunque, posiblemente, éstos no sean tan importantes. Las exposiciones durante la ventana crítica embrionaria pueden producir alteraciones estructurales al nacimiento; esta misma exposición en el adulto puede originar efectos funcionales o no estructurales, con diferente repercusión. Por ejemplo, exposiciones a diferentes disruptores endocrinos en el periodo prenatal pueden provocar esterilidad por destrucción de las células germinales. Sin embargo, el efecto de exposiciones similares en hembras adultas depende de la fase de desarrollo de los folículos ováricos (estructuras en constante desarrollo, en las que acontecen procesos continuos de proliferación y diferenciación celular); así, pueden inducir infertilidad irreversible o menopausia prematura en caso de destrucción masiva de folículos primordiales y primarios, o pueden inducir sólo interrupción reversible de la ciclicidad, por repercusión en la producción de esteroides ováricos y en la ovulación, cuando el daño se produce en folículos grandes en crecimiento o antrales. Estos efectos pueden manifestarse a corto, medio o largo plazo tras la exposición. Un problema añadido es la aparición de daños en el genoma de los oocitos expuestos, que pueden transmitirse a la descendencia (Hunt y col., 2003; Can y col., 2005). Estos ejemplos ilustran la importancia de estudios sobre disrupción endocrina en hembras en edad fértil.

Entre los disruptores endocrinos, existen grupos cuya capacidad para producir efectos a nivel reproductivo supone un tema controvertido; éste es el caso de los ftalatos, sustancias ampliamente usadas en la industria de fabricación de plásticos como plastificantes. Un plastificante es una sustancia añadida a la matriz del plástico para aumentar su flexibilidad, moldeabilidad y duración. Datos de la OMS indican que se producen 2,7 millones de toneladas/año de componentes plásticos; entre estos, los más abundantes son el bisfenol A, utilizado en una cantidad anual cercana a los 2 millones de toneladas y los ftalatos, en una cantidad anual aproximada de 400.000 toneladas. Los ftalatos interaccionan constantemente con la forma de vida humana, ya que intervienen en la fabricación de plásticos basados

en policloruros; principalmente el policloruro de vinilo (PVC). Son ampliamente utilizados en adhesivos y pegamentos, materiales de construcción y pintura (suelos de vinilo, ceras, pinturas, barnices), electrodomésticos, embalajes, tintas de imprenta, artículos de limpieza y detergentes, productos textiles, productos de higiene personal y cosméticos (perfumes, sombra de ojos, coloretes, esmalte de uñas, jabones y lacas), instrumental médico y fármacos (catéteres y aparatos de transfusión sanguínea y en el recubrimiento de píldoras médicas para evitar su digestión gástrica y favorecer su absorción en intestino), productos alimenticios y suplementos nutricionales (para aumentar su consistencia y palatabilidad), contenedores de comida y vajillas, juguetes infantiles y sexuales.

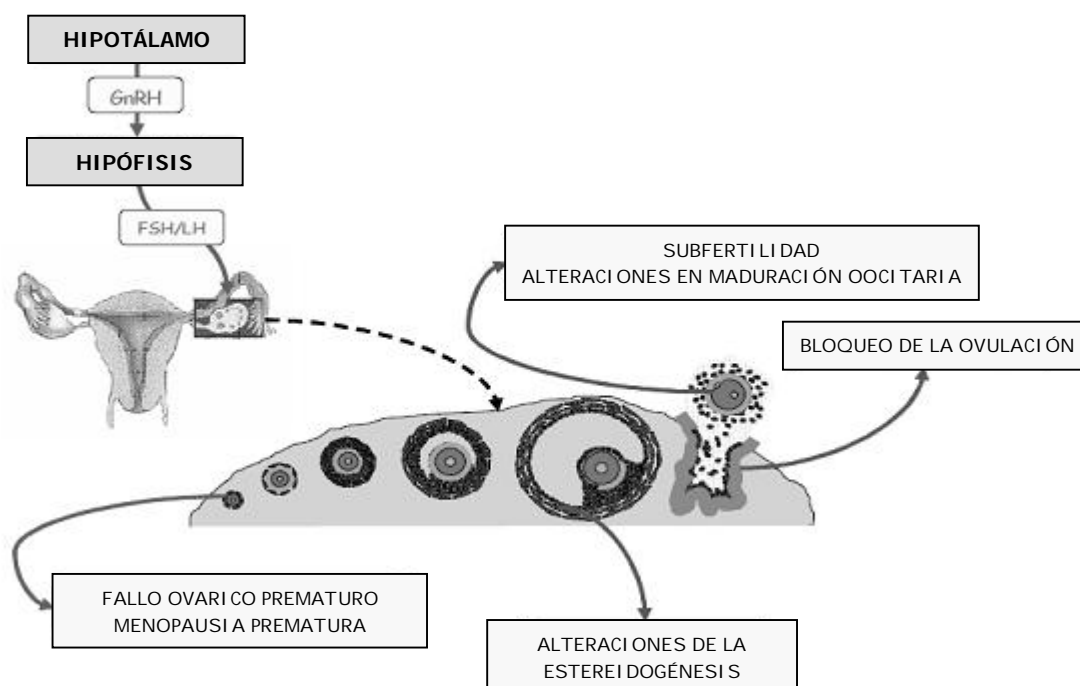


Figura 2.1. Diagrama esquemático de los lugares de actuación en el eje reproductivo de disruptores endocrinos (adaptado de Pocar et al., 2007).

La presencia de ftalatos, potencialmente tóxicos, en distintos fluidos y tejidos orgánicos de origen animal y humano ha sido relacionada en varias especies animales con diversas alteraciones estructurales y funcionales del organismo. Entre los ftalatos, el más utilizado, por económico, es el di(2-etilhexil)ftalato (DEHP).

2.3. ESTRUCTURA QUÍMICA, TOXICOCINÉTICA Y TOXICIDAD DEL DI(2-ETILHEXIL)FTALATO (DEHP)

El di(2-etilhexil)ftalato [DEHP; di(2ethylhexyl)phthalate] es un ftalato que también se denomina 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester, Bis(2-ethylhexyl) 1,2-benzenedicarboxylate, Bis(2-ethylhexyl) phthalate, Dioctyl phthalate, Phthalic acid dioctyl ester, Phthalic acid, bis(2-ethylhexyl) ester. Químicamente es un diéster del ácido ftálico; incoloro, prácticamente inodoro, y viscoso a temperatura ambiente. Es muy lipofílico, pero escasamente soluble en agua.

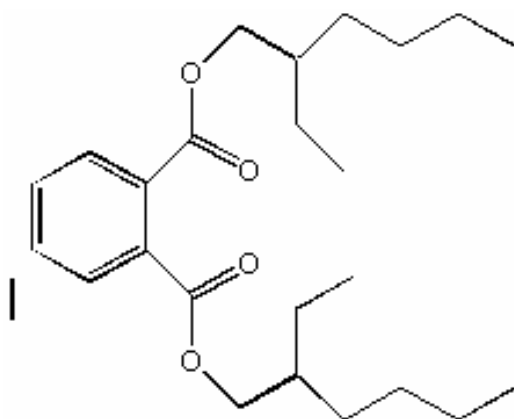


Figura 2.2. Fórmula semidesarrollada del di(2-etilhexil)ftalato DEHP.

El DEHP se utiliza principalmente como componente de materiales plásticos del tipo del policloruro de vinilo (PVC); por lo que es muy utilizado y, por tanto, ubicuo. Podemos encontrar DEHP en juguetes, productos de cuidado personal, útiles del hogar, mobiliario diverso, envases alimentarios, material de trabajo, cosméticos, material médico y sistemas de liberación de fármacos; incluso en el polvo que rodea los objetos (Becker y col., 2004). El DEHP posee una elevada tendencia a separarse de la matriz plástica debido a que no se une químicamente al PVC. Por ello, y por su elevada lipofilia, puede liberarse del plástico de forma relativamente sencilla y rápida cuando se pone en contacto con soluciones acuosas ácidas o lipídicas, o por acción del calor.

La alta producción de plastificantes, su ubicuidad, su elevada liposolubilidad, su facilidad para liberarse del PVC y su estabilidad en el medio ambiente favorecen su presencia en numerosos entornos (agua, tierra y aire); calculándose que la liberación al medio ambiente alcanza las 7.700 toneladas al año (ECPI, European Council for Plasticisers and Intermediates, 1996). Por ello, el riesgo de exposición de los organismos vivos a estos compuestos es elevado.

2.3.1. Toxicocinética. Exposición a DEHP

La exposición al DEHP puede ser directa (por contacto con cualquiera de los objetos que los contengan) o indirecta (por la ingestión de alimentos que contienen o que están en contacto con este compuesto) y, debido a su ubicuidad, se podría decir que es prácticamente constante. Por ello, se han encontrado residuos de DEHP o sus metabolitos en distintos fluidos y tejidos orgánicos en seres humanos y en animales no expuestos experimentalmente al producto (CERHR, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, 2006).

Los ftalatos pueden alcanzar el medio interno en el hombre mediante administración directa a la sangre (vía endovenosa), atravesando la piel (vía transdérmica) o alcanzando los pulmones por vía aérea (vía pulmonar). Sin embargo, la principal fuente de exposición a los ftalatos (en individuos sanos, exceptuando la exposición por ciertos tratamientos médicos como la diálisis) es la ingestión de alimentos contaminados. Según el CEHRH (2006), un 90% de la ingesta de DEHP proviene de los alimentos, ya que este compuesto se ha incorporado a la cadena alimenticia; siendo la contaminación variable según la materia prima, contenido graso, proceso de fabricación y envasado del alimento. Esta estimación se basa en las elevadas concentraciones de DEHP encontradas en carnes (0,05 µg/g), grasas y aceites (2,4 µg/g) y derivados lácteos (0,96 µg/g). Si se extrapola la ingesta diaria media de estos productos estimada para un humano adulto, estos niveles suponen una ingesta de DEHP que oscila entre 5,5 y 16,9 µg/Kg peso vivo/día (Clark y col., 2003a, 2003b).

Puesto que la mayor exposición a DEHP se produce por ingestión oral, la mayoría de los estudios toxicológicos realizados *in vivo* hasta el momento han utilizado la administración vía oral del compuesto. En estos estudios, el cálculo de la exposición total debe realizarse a partir del sumatorio de todas las fuentes y rutas de exposición. Sin embargo, tanto en el hombre como en los animales, no se han identificado y cuantificado con exactitud todas las fuentes posibles de exposición, por lo que su valor real será probablemente mayor al calculado como sumatorio de las fuentes conocidas. Un ejemplo de exposición humana de la que no se tienen datos es la que deriva de las malas prácticas culinarias, como es el calentamiento en microondas de alimentos contenidos en envases plásticos. Por ello, los niveles de exposición y el consiguiente comportamiento cinético del DEHP se han estimado a partir de estudios de exposición indirecta; mediante análisis probabilístico, basados en medidas de DEHP o MEHP (uno de sus principales metabolitos) en sangre, alimentos, agua, aire o medio ambiente. Otra alternativa ha sido la estimación de la exposición a partir de datos de concentraciones de DEHP y sus metabolitos en la orina; esta medición adolece de una falta de estimación de otras vías de excreción (ej. heces, bilis) reabsorción entérica y retención o acumulación corporal.

A pesar de los condicionantes citados, la exposición indirecta media se estima actualmente en 8,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso vivo/día para adultos y 25,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso vivo/día y para niños entre 7 meses y 4 años (Clark y col., 2003a). Otros autores establecen un rango entre 4 y 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso vivo/día para un adulto de 70 kg (Petersen y Breindahl, 2000). En las estimaciones de exposiciones basadas en medidas de metabolitos de DEHP en orina, los valores oscilan entre 6,4 (percentil del 95; Wittassek y col., 2007, 2008) y 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso vivo/día (percentil del 95; Koch y col., 2004a). El CERHR, en su informe del año 2006, utiliza diferentes estudios previos (Doull y col., 1999; David 2003; Koch y col., 2003a,c 2004a,b,c), para establecer un rango de exposición para la población general en Estados Unidos, a partir de los 6 años, de 1 a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso vivo/día.

La Comisión Europea (CSTEEE, 2004; EFSA, 2005) definió 48 µg/kg peso vivo/día como ingesta diaria tolerable (IDT) de DEHP. Sin embargo, en el cálculo de esta IDT debería tenerse en cuenta la ingestión de otros ftalatos que presentan los mismos tejidos diana; dicha IDT puede ser fácilmente superada en el caso de determinadas poblaciones de riesgo (individuos sujetos a intervenciones médicas en que la utilización de dispositivos de PVC puede dar lugar a altas exposiciones a DEHP, como la diálisis). En estos casos, la exposición real supera ampliamente la estimada para la población general (Calafat y col., 2004a; Green y col., 2005; Koch y col., 2005a,c). Así, en los neonatos prematuros, la diferencia en la exposición resulta aún mayor, pudiendo alcanzar rangos entre 0,13 y 6 mg/kg peso vivo/día (CERHR, 2006 con datos de Calafat, 2004a); agravado por el deficiente desarrollo de la función metabólica y de los mecanismos de excreción en estos niños prematuros.

Por otra parte, las estimaciones de la exposición basadas en datos de excreción urinaria presentan varias limitaciones. Los estudios realizados por Kohn y col. (2000) y Hauser y col. (2004) muestran una elevada variabilidad individual en la excreción de MEPH (principal metabolito utilizado en las estimaciones) y concluyen que la estimación de la exposición basada en el cálculo de la excreción de MEPH sólo permitiría calcular el orden de magnitud de la exposición.

Finalmente, debe considerarse que el nivel de exposición no es, por sí sólo, determinante; además, es importante conocer sus consecuencias, en humanos y animales, para poder así establecer medidas sanitarias de control que permitan reducir la presencia de estos compuestos en los distintos niveles de la cadena trófica. En este contexto, el conocimiento del comportamiento cinético de los ftalatos (absorción, distribución en el organismo, posible acumulación en tejidos, transformación en metabolitos y actividad biológica de éstos, velocidad de eliminación y vías de excreción) resulta imprescindible.

2.3.2. Toxicocinética. Administración experimental de DEHP

En las diferentes especies animales, incluido el hombre, los principales estudios son poblacionales, mediante evaluación del compuesto en distintos tejidos de individuos expuestos a diferentes fuentes de DEHP (Schmid y Schlatter, 1985; Blount y col., 2000; Koch y col., 2003 a,c; Rhind y col., 2005; Calafat y col., 2006a,b). La mayoría de los estudios cinéticos con administración experimental se han llevado a cabo en roedores, aunque existen trabajos realizados en perros, minipigs primates y ovejas (Oishi y Hiraga, 1982; Ikeda y col., 1980; Ljungvall y col., 2004; Ito y col., 2005; Rhind y col., 2005).

Para la realización de estos estudios, se han desarrollado diferentes métodos analíticos que permiten cuantificar la concentración de DEHP y sus metabolitos en suero (Kambia y col., 2001; Kessler y col., 2001; Takatori y col., 2004), leche materna (Calafat y col., 2004b; Mortensen y col., 2005), saliva (Silva y col., 2005a) y fluido amniótico (Silva y col., 2004).

A. Absorción

La mayoría de los estudios sobre absorción de DEHP se han realizado utilizando administración oral y, pocos, otras vías (inhalatoria, dérmica y parenteral). El porcentaje de absorción de DEHP tras administración oral en ratas, en primates no humanos y en humanos adultos es próximo al 50% para dosis menores o iguales a 200 mg/kg. Otros estudios señalan que en humanos es algo menor, entre 37 y 46 % (Ikeda y col., 1980; Lake y col., 1984; Schmid y Schlatter, 1985; Short y col., 1987; Bronsch, 1987). Dosis superiores parecen limitar el proceso de absorción en primates no humanos, no así en roedores (Rhodes y col., 1983).

Se ha observado que, tras la administración oral de DEHP en las especies estudiadas, el compuesto sufre una reacción metabólica de primer paso (transformación presistémica), siendo catabolizado por lipasas entéricas que lo

transforman en un monoéster, el MEHP [mono(2-etilhexil)ftalato; White y col., 1980]. Este compuesto, que también tiene efectos tóxicos (Albro y Lavenhar, 1989), es absorbido vía gastrointestinal, induciendo un rápido incremento de sus niveles plasmáticos. La extensión de esta transformación depende de varios factores:

- Particularidades de especie e individuo.
- Edad del animal; en experimentos realizados *in vitro*, se ha observado que las ratas jóvenes presentan mayor absorción intestinal que las adultas (Sjöberg y col., 1985c); esta diferencia es independiente de diferencias en la actividad de las lipasas entre jóvenes y maduras (Albro y Thomas, 1973)
- Sexo; existe mayor actividad de las lipasas en ratas machos que en hembras (Albro y Thomas, 1973).
- Presencia de alimento; existe mayor transformación en individuos alimentados que en los mantenidos en ayuno (Albro y Thomas, 1973).
- Dosis; se ha observado un incremento de la concentración de DEHP sin hidrolizar en hígado de ratas con dosis orales de 450 mg/kg peso vivo (Albro y col., 1982a).

Sin embargo, no se han observado diferencias cualitativas en el metabolismo presistémico entre especies; en un estudio comparativo, Lake y col. (1977) concluyeron que la hidrólisis es cualitativamente similar entre diferentes especies (rata, hurón, babuino y hombre), pudiendo observarse sólo diferencias cuantitativas. En roedores adultos, especialmente en rata, prácticamente toda la dosis de DEHP administrado oralmente es transformada en MEHP (White y col., 1980). Por el contrario, en estudios realizados en humanos y ovinos no se ha encontrado una degradación total y se puede encontrar DEHP distribuido por distintos tejidos tras su administración oral (Boerjan y col., 2002; Rhind y col., 2005). Así, en mujeres, se han visto concentraciones en suero de 0,18 µg/ml (Cobellis y col., 2003) y 0,30 µg/ml (Luisa y col., 2006), Con un rango de 0-0,63 µg/ml.

B. Distribución

Los estudios sobre disposición de DEHP en la especie humana son muy escasos; sólo se dispone de dos estudios realizados con pacientes de cáncer (con poblaciones de 2 y 6 individuos en cada uno de ellos) que recibieron soluciones intravenosas de concentrado de plaquetas conteniendo DEHP. En ellos, el DEHP presentaba una vida media de 28 minutos; recuperándose, como metabolito en orina, más del 50% de la dosis durante las 6 primeras horas post-administración (Peck y Albro, 1982) y entre el 60% y 90% de la dosis en las 24 horas post-administración (Rubin y Schiffer, 1976). En cuanto a la administración oral, en un estudio con dos individuos, se estimó una semivida de eliminación urinaria de 12 horas (Schmid y Schlatter, 1985).

Los estudios realizados en humanos adolecen, como en otro tipo de trabajos, de severas limitaciones en cuanto a un bajo número de individuos o al hecho de que sean pacientes con patologías graves (principalmente, leucemia o fallo renal crónico) o sometidos a hemodiálisis crónicas (Malik y col., 1993, señalaron una fuerte correlación entre la concentración de DEHP en suero post-diálisis y el número de años que los pacientes se sometían a la misma).

Las alteraciones propias de estos procesos, e incluso la interacción farmacológica con la terapia medicamentosa concomitante que reciben pueden modificar el comportamiento cinético del DEHP (Peck y Albro, 1982; Pollack y col., 1985b; Malik y col., 1993). Una situación parecida ocurre en estudios de neonatos, habitualmente realizados con poblaciones pequeñas. Por ejemplo, Sjöberg y col. (1985a,b) publicaron sendos estudios con cuatro y seis recién nacidos (y, en cada estudio, uno de ellos era prematuro) en que se realizaron una o dos transfusiones, mediante las cuales se les infundían concentraciones variables de DEHP (0,8 a 4,2 mg/kg); las concentraciones plasmáticas de DEHP inmediatamente tras las transfusiones variaron entre 3,4 y 11 µg/kg, con una vida media de eliminación de 10 horas, y sin acumulación gradual de DEHP y MEHP en el curso de dos transfusiones realizadas, con un intervalo de 16 y 23 h, en dos de los neonatos.

En todo caso, los estudios parecen señalar que las concentraciones de DEHP decrecen rápidamente de la sangre pero que, posteriormente, se detecta, aunque en pequeñas concentraciones, durante periodos prolongados en sangre y tejidos. Este fenómeno puede deberse bien a una acumulación en tejidos o bien a que sufra una rápida eliminación sistémica; ya sea por extensos y rápidos fenómenos de transformación metabólica y/o de excreción biliar o renal.

Los estudios encaminados a determinar una posible acumulación no son concluyentes. En roedores, no se ha observado acumulación gradual tras la administración por infusión endovenosa (Sjöberg y col., 1985d); tampoco se han encontrado evidencias de acumulación en tejidos tras la administración por vía oral en experimentos realizados con ratas (Daniel y Bratt, 1974; Pollack y col., 1985a) y titíes (Shell, 1982; Rhodes y col., 1986). Sin embargo, Rhodes y col. (1983) describen que, siete días después de la administración endovenosa de DEHP en titíes, sólo un 60% de la dosis administrada se había eliminado (40% en orina y 20% en heces); un 28% quedaba acumulado en tejidos, principalmente en pulmones.

En otras especies, existen algunos estudios en los que se han detectado concentraciones significativas de DEHP en diferentes tejidos tras su administración oral. Así, en ovejas y corderos, expuestos entre 1 y 30 meses a la ingestión de pastos tratados con DEHP, se observó acumulación en hígado, grasa renal y músculo (Rhind y col., 2005). En cerdos, tras administración vía oral de dosis de 125 mg/Kg peso vivo/día, se ha observado acumulación en grasa renal y subcutánea, músculo, corazón, riñón, hígado y pulmón; en pollos broilers tratados con 135 mg/Kg peso vivo/día se ha observado acumulación en músculo, tejido adiposo, piel e hígado (Jarosova y col., 1999). En ambas especies, las concentraciones de DEHP disminuyeron a los 14 días por depleción tisular (que alcanza un 50% en cerdos y es ligeramente menor en los pollos); a los 28 días, sólo se mantenían niveles detectables en grasa renal y pulmón en cerdos y en grasa, piel y músculo en pollos.

C. Excreción

En todas las especies animales estudiadas, la excreción de DEHP se produce de forma rápida y extensa, mayoritariamente por orina y heces, en forma de metabolitos; si bien está condicionada por los niveles de ftalatos en sangre y por la vía de administración (en vía intraperitoneal, existe un alto porcentaje de DEHP que no es metabolizado (Rhodes y col., 1983, 1986).

Los porcentajes de excreción de DEHP por orina y heces y la velocidad con que sucede el proceso puede variar entre vías de administración y especies animales. Por ejemplo, Koch y col. (2006) señalan que, en humanos, un 70% de la dosis oral se puede encontrar en forma de metabolitos en orina a las 24 horas de su administración. Solamente el 10-15% de una dosis oral única (30 mg) es eliminado en la orina durante las primeras 48 h post-administración (Schmid y Schlatter, 1985), frente al 31%, de dosis de 213 mg, que se elimina en forma de metabolitos (Bronsch, 1987); del porcentaje de dosis excretada, más del 53% se recupera en las cuatro primeras horas tras la exposición y el 90% dentro de las 24 horas.

Los datos en administraciones intravenosas en primates no humanos son similares; la excreción en orina superaba el 70% de la dosis a las 24 horas en monos verdes (Albro y col., 1981; Peck y Albro, 1982). Sin embargo, en administraciones intravenosas en monos titíes, sólo un 40% de la dosis era excretado en orina y un 20% en heces; lo que indica una proporción de 2 a 1 entre la ruta de excreción urinaria y fecal (Rhodes y col., 1983).

Koch y col. (2003a, 2004a y 2005b) han propuesto un modelo de eliminación multifase para explicar la excreción urinaria de los metabolitos de DEHP en humanos tras administración de dosis múltiples por vía oral. En su modelo identifican distintas fases, con velocidad y semivida diferentes para la excreción de cada metabolito del DEHP; los más rápidos son el MEHP, el MEHHP (metabolito mayoritario) y el MEOHP (fase de 4-8 horas, con semivida de 2 horas). Otros

metabolitos, como el mono(2-etil-5-carboxipentil)ftalato y el mono(2-carboximetilpentil)ftalato, predominan en una fase posterior, que comienza a las 12 horas de la exposición. Sin embargo, en la velocidad de excreción en seres humanos se han encontrado grandes variaciones que se han justificado por las diferencias dietéticas de los escasos individuos sometidos a estudio. Resultados similares han sido encontrados en macacos cinomolgos, los datos de eliminación, tanto la cantidad de dosis excretada como el porcentaje relativo de metabolitos encontrados en orina, presentan una elevada variabilidad interindividual (Barr y col., 2003), al igual que en humanos (Hauser y col., 2004).

En otras especies, debe destacarse que el cerdo (Ikeda y col., 1980), al igual que los primates, muestra un claro predominio de la vía de excreción urinaria (79%); sin embargo, en perros y ratas la mayor parte de la dosis administrada se elimina por heces (53 y 75%, respectivamente). En todas estas especies, la excreción urinaria se produce en forma metabolizada, mostrando sólo trazas del ftalato original. También se observaron diferencias entre especies en cuanto a la velocidad del proceso; la semivida de eliminación en el cerdo (6,3 horas; Ljungvall y col., 2004) resulta menor que en el hombre (12 horas; Schmid y Schlatter, 1985; Koch y col., 2005b); se considera que la especie en la que la excreción se produce de forma más rápida es la rata, seguida de los cerdos y más prolongada en perros, si bien en las tres especies se considera completada en 4 días (Ikeda y col., 1980).

2.3.3. Toxicidad

La mayoría de los estudios toxicológicos realizados hasta la actualidad con ftalatos, incluido el DEHP, han utilizado roedores como animales de experimentación, por lo que sus resultados son difícilmente aplicables a otras especies de mamíferos superiores, incluida la humana.

El mecanismo toxicológico, tanto del DEHP como del MEHP y otros metabolitos activos, se basa en la inducción de la proliferación de peroxisomas, uniéndose al PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), molécula que actúa

mediando los efectos de distintas sustancias de origen endógeno y exógeno (Peters y col., 1997; Ward y col., 1998; Cattley y col., 1998; Maloney y Waxman, 1999). Al unirse al PPAR α , los ftalatos modifican la expresión de algunos genes, lo que desencadena una modificación en el metabolismo interno celular que se traduce en alteraciones de la producción y liberación hormonal por parte de las células secretoras. Todo ello produce modificaciones en el sistema endocrino y provoca finalmente efectos tóxicos en distintos órganos.

La toxicidad aguda del DEHP es muy baja; se han descrito obstrucciones bronquiales y asma por presencia de DEHP en el ambiente doméstico (Jaakoola y col., 1999). Su actuación se produce principalmente por exposiciones más continuas; así, diferentes estudios con administración de múltiples dosis en régimen subagudo o crónico muestran la aparición de importantes efectos adversos sobre hígado, riñón, aparato reproductor, alteraciones en el desarrollo y una potencial capacidad como disruptor endocrino (Huber y col., 1996; Sharpe, 2000). En animales de laboratorio, los principales órganos diana para la toxicidad inducida por DEHP son reproductor, riñón, e hígado; aunque también se han observado efectos sobre el corazón, tiroides y pulmón y descenso de algunos parámetros sanguíneos (principalmente, hipolipidemia con disminución de colesterol y triglicéridos).

A. Toxicidad renal

Los efectos tóxicos sobre el riñón que se han descrito tras la administración de DEHP son dependientes de la dosis e incluyen modificaciones fisiológicas y estructurales macro y microscópicas; principalmente, disminución del aclaramiento de la creatinina, incremento absoluto y relativo del peso del riñón, incremento de la incidencia e intensidad de la mineralización de la papila renal, del pigmento de las células tubulares y de la nefropatía progresiva crónica. La mayoría de estos cambios fueron observados en individuos de ambos sexos, en diferentes especies animales y tras distintos tiempos de exposición. En los estudios realizados a largo plazo en rata y ratón (Moore, 1996, 1997), no se encontraron indicios de reversibilidad de los

efectos renales descritos al cesar la exposición a DEHP. El NOAEL definido para toxicidad renal ha sido de 28,9 mg/kg/día (ECB, 2008).

B. Toxicidad hepática

En el hígado, los efectos más destacados tras la administración o exposición no experimental a DEHP son hepatomegalia e inducción de tumoraciones hepatocelulares. A nivel celular, la exposición a DEHP produce incremento de la síntesis de DNA y de la tasa de división celular (mecanismos causantes de la hipertrofia del órgano) y proliferación de peroxisomas (con lo que se incrementa la tasa de actividad metabólica).

Sin embargo, esta respuesta hepatotóxica al DEHP, como a otras sustancias con actividad proliferativa de los peroxisomas (PPs), presenta marcadas diferencias según la especie animal. La rata y el ratón son muy sensibles, mientras que el hámster, el cobaya, los monos y el hombre parecen ser relativamente insensibles o necesitan dosis más elevadas para presentar cuadros similares a los descritos en roedores; estas diferencias se han relacionado con el bajo nivel de expresión de receptores activos para PPAR α (diana toxicológica del DEHP) en comparación con el hígado de los roedores (Tugwood y col., 1996; Palmer y col., 1998; Woodyatt y col., 1999). En este sentido, un documento de la "International Agency for Research on Cancer" (IARC, 1995) ha concluido que el mecanismo por el cual el DEHP incrementa la incidencia de tumores hepáticos en roedores (activación de PPAR α) no es relevante en la especie humana; por lo tanto, basándose en la evaluación de los datos disponibles, la Comunidad Europea no consideró una caracterización del riesgo con DEHP a este nivel.

C. Toxicidad reproductiva y sobre el desarrollo

Los resultados de diferentes estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, indican que los efectos tóxicos del DEHP pueden ser causados bien por disrupción de la función

endocrina reguladora del ciclo sexual, bien por efectos directos sobre los órganos reproductores; ya sea durante la diferenciación sexual o en el periodo adulto (Jones y col., 1993; Gray y col., 1999).

La mayoría de los estudios de toxicidad del DEHP sobre el aparato reproductor han sido realizados en roedores machos, por su mayor simplicidad; a pesar de la importancia que la toxicidad de estos compuestos puede tener en hembras adultas por su repercusión tanto en su salud como en la de sus crías, durante la gestación y la lactación.

En machos, estudios realizados en ratas (Agarwal y col., 1986) y ratones (Lamb y col., 1987) muestran alteraciones en la fertilidad, ya que disminuye el número de apareamientos fértiles; 20% (4/20) frente a 90% en machos control (Lamb y col., 1987). Las alteraciones aparecen tras exposición al tóxico de animales adultos o en distintas etapas del desarrollo (especialmente el periodo perinatal); obviamente, estos últimos son más sensibles y dosis más bajas provocan diferentes efectos sobre la estructura y la función del tracto reproductivo (Gray y col., 2000; Swan, 2005). Así, en estudios realizados con ratas expuestas a DEHP durante el periodo prenatal o de lactación se observaron efectos irreversibles a dosis similares al LOAEL estimado para individuos adultos (3,5 mg/kg/día), que no afectaban a sus madres (Gray y Butterworth, 1980; Sjöberg y col., 1985c, 1986b; Arcadi y col., 1998; Wolfe y Layton, 2003). El DEHP produce alteraciones morfoestructurales en los órganos y tejidos del aparato reproductor; las alteraciones principales son disminución del peso de los testículos, alteración de la proliferación de las células de Sertoli, atrofia testicular y atrofia de los túbulos seminíferos (ATSDR, 2002), lo que afecta seriamente a la viabilidad espermática.

Las células de Sertoli son la principal diana toxicológica del DEHP (Poon y col., 1997; Arcadi y col., 1998; Li y col., 1998), resultando en un efecto antiandrogénico ya que la producción de testosterona por estas células se ve disminuida, en ratas, en presencia del tóxico (Mylchrest y Foster, 1998; Gray y col., 1999). Los datos obtenidos en diferentes especies (Lake y col., 1976; Gray y col., 1977, 1982; NTP,

1982; ICI, 1982b; CMA, 1984b,c; Lamb y col., 1987; Ganning y col., 1990; Eastman Kodak, 1992a; Moore, 1996, 1997; Poon y col., 1997; Schilling y col., 2001; Wolfe y col, 2003) permiten estimar valores de NOAEL entre 3,7 y 4,8 mg/kg/día para ratas y 98,5 mg/kg/día en ratones y valores de LOAEL de 1,2 g/kg/día en hurones. En otras especies se ha podido constatar una cierta resistencia al desarrollo de este tipo de toxicidad; así, el hámster presenta efectos menos relevantes (Gray y col., 1982) y en titíes se observó una ausencia total de toxicidad testicular al DEHP (Kurata y col., 1995, 1996 y 1998; Tomonari y col., 2006). Estas diferencias inter-especies podrían deberse a variaciones toxicocinéticas o experimentales (número y edad de individuos o adecuación del modelo animal utilizados en los estudios).

La extrapolación de estos datos a mamíferos superiores o, incluso, a la especie humana resulta difícil ya que, aunque la replicación de las células de Sertoli y los procesos de espermatogénesis son más similares con titíes que con roedores, no se puede rechazar la evidencia de los resultados encontrados en ratas y, por tanto, no se puede considerar que no sean relevantes para el hombre u otros mamíferos. Por ello, los efectos testiculares inducidos por DEHP en ratas han sido tenidos en cuenta y el NOAEL de 4,8 mg/kg/día (Wolfe y Layton, 2003) ha sido seleccionado para la caracterización del riesgo humano por la Unión Europea (2008).

En hembras, la mayoría de los estudios han sido también realizados en roedores; principalmente en exposiciones a largo plazo y/o altas dosis durante periodos fetales y prepuberales (Calafat y col., 2006; Ma y col., 2006; Sekiguchi y col., 2003, 2006). En ellos, se ha demostrado la actividad del DEHP como disruptor endocrino; si bien no se ha demostrado una acción directa sobre receptores estrogénicos, sí se tiene constancia de una disminución en la producción de estradiol por parte del ovario (Berman y Laskey, 1993; Davis y col., 1994). Entre las hipótesis que justificarían esta baja síntesis de estrógenos se incluyen efectos sistémicos y efectos locales. Los primeros se deberían a una disminución en la capacidad liberadora de gonadotropinas a nivel hipofisario, que afectaría al eje hipotálamo-pituitaria-gónada (Hirosawa y col., 2006; Gunnarsson y col., 2008) e incluso llegarían a alterar

la descarga preovulatoria de LH y la ovulación (Davis y col., 1994; Sekiguchi y col., 2006). Los efectos locales se relacionarían con la inhibición en la transcripción de la enzima aromatasa y, con ello, una reducción de la conversión de testosterona a estradiol (Lovekamp-Swan y Davis, 2003).

Esta deficiencia de estrógenos se ha relacionado con alteraciones en la ovulación (supresión o demora) y disminución de la fertilidad, aumentando la incidencia de ovarios poliquísticos y ciclos anovulatorios en ratas (Davis y col., 1994). El alargamiento o irregularidad de los ciclos también fueron descritos por Takai y col., (2009). En un estudio de apareamientos cruzados en ratones, las hembras expuestas a DEHP presentaron nulo índice de fertilidad; ninguna de ellas fue capaz de llevar a término una gestación (0/16) tras el apareamiento con machos no tratados, frente al 90% de éxito en los controles (Lamb y col., 1987).

La exposición a DEHP y sus metabolitos también podría afectar, a nivel ovárico, a la maduración del oocito; estudios de Anas y col. (2003) en ganado bovino muestran que el MEHP retrasa la maduración meiótica de los oocitos, incrementando, de forma dosis-dependiente, el número de oocitos que permanecen en estado intermedio (metafase I) o inmaduro (vesícula germinal). Tras retirar el ftalato, un número significativo de oocitos eran capaces de desarrollarse a estadios de metafase II, mostrando la reversibilidad del efecto. También se ha observado vacuolización de células del estroma ovárico y aumento de atresia en folículos antrales (Takay y col., 2009) y disminución de la secreción de progesterona en células de granulosa luteinizada en ratas (Schechnikova y col., 2007) y cerdos (Mlynarcikova y col., 2009).

El desarrollo embrionario también puede ser afectado por la exposición a DEHP. La exposición a niveles elevados del tóxico durante la gestación podría condicionar el desarrollo embrionario normal; bien de forma directa (Lee y col., 2004) o bien de forma indirecta, perturbando la homeostasis uterina (vía PPAR α) e induciendo un desarrollo fetal anormal (Xu y col., 2008). Las alteraciones en el desarrollo

embrionario y postnatal por exposición a DEHP se deben a su capacidad, y la de sus metabolitos, de distribuirse ampliamente por el organismo (como ya comentamos en el apartado de cinética) y atravesar barreras biológicas como la placentaria o la mamaria. Ello les permite alcanzar concentraciones tóxicas efectivas en el feto y en la leche materna (Parmar y col., 1985; Dostal y col., 1987; Tandon y col., 1990). En ratones, el DEHP ha demostrado ser embriotóxico y teratogénico a dosis orales inferiores a aquellas que producen toxicidad observable en la hembra gestante. Debido a estas diferencias, los NOAEL estimados por vía oral para toxicidad maternal y toxicidad del desarrollo han resultado en grandes diferencias (600 vs 20 mg/kg/día, respectivamente según Lamb y col., 1987 y 91 mg/kg/día vs 44 mg/kg/día según NTIS, 1984 y Tyl y col., 1988).

Finalmente, otro efecto sobre la función reproductiva femenina, descrito en mujeres, sería la predisposición a la aparición de endometriosis (Cobellis y col., 2003; Reddy y col., 2006).

2.4. LA OVEJA COMO MODELO EXPERIMENTAL

El efecto más evidente de un compuesto disruptor endocrino es la alteración de las concentraciones plasmáticas y tisulares de diferentes hormonas y de la actividad reproductiva de los individuos expuestos; la regulación de ambas depende de la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Por lo tanto, el estudio de efectos disruptores, tanto en machos como en hembras, debería determinar la funcionalidad de hipotálamo, hipófisis y gónadas. Esta valoración puede abordarse mediante estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (Karsch y Battaglia, 2002).

En el caso de la hembra, los estudios *in vivo* de los efectos de los disruptores endocrinos sobre *hipotálamo e hipófisis* se basan en el seguimiento de las concentraciones séricas de las hormonas sexuales (GnRH, FSH y LH) y en la determinación del mecanismo dentro del complejo sistema de regulación neuroendocrina, por el que se produce la disrupción (Bretveld y col., 2006). Estos estudios pueden complementarse con cultivos celulares, que permiten estudiar la disfunción secretora de ambas estructuras y los mecanismos celulares implicados en dicha alteración funcional (Faure y col., 2005).

Los efectos de los disruptores endocrinos sobre el *ovario* se pueden reflejar tanto en su morfología como en su funcionalidad y, principalmente en el *desarrollo folicular* y la viabilidad de los *oocitos*. La disfuncionalidad ovárica se manifiesta mediante alteraciones en la ciclicidad, alteraciones en el comportamiento reproductivo (ausencia de manifestación de celo) y ausencia o retraso en la ovulación, que suelen resultar en infertilidad (Bretveld y col., 2006). Estos efectos son tanto indirectos, por interferencia del tóxico en la actividad de las hormonas sexuales en el ovario, como directos, por toxicidad (alterando la señalización o el metabolismo celular) sobre las células del estroma o de los folículos ováricos (incluido el oocito); incluso interfiriendo en la regulación intra e inter-ovárica (Borgeest y col., 2002; Hoyer, 2005). Cada estado de desarrollo folicular presenta unos patrones propios de sensibilidad a las gonadotropinas, de producción de esteroides y de mecanismos de

regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada; así, las células que componen el folículo pueden encontrarse alteradas en diferentes niveles cuando se altera el sistema endocrino. Por tanto, el patrón de infertilidad inducido por la exposición a los diferentes EDCs difiere en función del tipo de folículo (primordial, preantral o preovulatorio) que se encuentre afectado (Cortvrindt y Smitz, 2002).

La evaluación mediante screening *in vivo* de los folículos y su dinámica de crecimiento es rutinaria en el trabajo de investigación (tanto de fisiología como de farmacología) con rumiantes (Campbell y col., 2003); se realiza mediante técnicas ultrasonográficas y mediante seguimiento de los niveles de las hormonas producidas en el eje endocrino (principalmente, estradiol, inhibina A, FSH y LH). La valoración *in vitro* se basa principalmente en los cultivos de células de granulosa, que se desarrollaron como posibles bioensayos alternativos para valorar la funcionalidad folicular y ovárica; sin embargo, fracasaron debido a la ausencia de correlación en los resultados con los test *in vivo*. Este fallo se debe posiblemente a la ausencia de los efectos, mediados por factores de crecimiento, entre las distintas células que componen el ovario (factores intraováricos), incluido el propio folículo (factores intrafoliculares); por ello, actualmente, se están desarrollando modelos basados en cocultivos de células de granulosa y teca y en cultivos de folículos completos que permitan valorar la función ovárica y folicular (Cortvrindt y Smitz, 2002; Allegrucci y col., 2003).

La complejidad de la fisiología de la reproducción, en cuanto a la regulación neuroendocrina de todos los procesos, dificulta en gran medida el desarrollo de modelos completos y la elección de marcadores de la actividad tóxica de los compuestos. Por ello, los estudios realizados en la actualidad se basan principalmente en modelos *in vivo*. Si bien se han desarrollado modelos *in vitro* que intentaban ofrecer una alternativa al uso de animales de experimentación, éstos no reflejan los efectos ni los mecanismos de acción que se producen *in vivo*; sobre todo, cuando se evalúan sustancias que actúan como disruptores endocrinos, cuyo efecto final resulta de la acción sobre distintos órganos y de la alteración de la

comunicación entre ellos. Sin embargo, los test *in vitro* tienen validez como ensayos preliminares (pre-screening) o como parte de los protocolos para estudio de mecanismos de acción a nivel celular y molecular (Zacharewski, 1998).

- El uso de modelos animales para la valoración de la actividad disruptora endocrina de diferentes xenobióticos se basa principalmente en el estudio de:
- Efectos sobre la reproducción en la generación parenteral (F_0) y sobre la progenie (F_1) hasta que ésta alcanza la madurez sexual tras exposición parenteral previa a la gestación. Los resultados están fundamentalmente referidos al género masculino (calidad y viabilidad espermática) y, en escasa proporción, al género femenino (índices de fertilidad).
- Efectos sobre el desarrollo de la progenie (F_1) con especial atención a los procesos de embriotoxicidad y teratogenicidad en los experimentos realizados tras exposición durante el periodo de embriogénesis.
- Efectos sobre el desarrollo de la progenie (F_1) con especial atención a la toxicidad en el periparto y periodo post-natal en los experimentos con exposición durante el último tercio de la gestación.

Sin embargo, la última normativa editada por la EMEA (CHMP/203927/2005), indica que los estudios de toxicidad reproductiva deben incluir, en sus objetivos, la valoración de efectos sobre la reproducción en la generación parenteral (F_0): cualquier efecto en los órganos reproductores o en el sistema endocrino femenino o masculino, incluyendo: producción y transporte de gametos, ciclo reproductivo, comportamiento sexual, fertilidad, gestación, parto, características de la camada y lactación y cualquier otra modificación de cualquier otra función que dependa de la integridad del sistema reproductor.

Con anterioridad a la publicación de esta normativa, y desde hace algunos años, distintos autores vienen señalando que los modelos toxicológicos desarrollados y validados en la actualidad para estimar el riesgo sobre la función reproductiva y el

desarrollo no son adecuados para evaluar la seguridad del uso de medicamentos, ni el posible impacto de la exposición a otros xenobióticos y contaminantes medioambientales; especialmente aquellos con potencial efecto disruptor endocrino (Mantovani y col., 1999; Collins, 2006). Esta situación es válida para ambos sexos, pero es más acusada aún en el caso de pruebas que evalúan posibles efectos sobre la integridad reproductiva de las hembras, tanto de la generación parenteral como de la progenie (Cortvrindt y Smitz, 2002).

Establecer un modelo experimental y epidemiológico para evaluar el riesgo toxicológico sobre la reproducción y el desarrollo de un disruptor endocrino es realmente complejo. La elección de la especie animal sobre la que han de realizarse los estudios (tanto *in vivo* como *in vitro*) es un paso importante, ya que los resultados obtenidos en los mismos han de ser aplicables a los sistema de control de salud pública. En la actualidad, la mayoría de los estudios toxicológicos sobre reproducción se realizan en roedores o en lagomorfos, aprovechando la brevedad de su desarrollo, ciclo sexual y gestación (lo que facilita la realización de estudios hasta de dos generaciones).

Sin embargo, sería necesario contrastar los datos obtenidos con los de otras especies, mamíferos superiores, cuya fisiología reproductiva sea más semejante a la humana. La necesidad de modelos experimentales fiables para la valoración de toxicidad reproductiva es prioritaria en hembras; en ellas, el menor número de gametos y la reducida accesibilidad a los mismos dificultan los estudios frente a los realizados en machos. Además, las alteraciones hormonales en las hembras de especies mamíferas pueden afectar también a los procesos de fertilización e implantación del embrión, así como al desarrollo embrionario, prenatal y neonatal de la progenie (Neubert, 1997; Cortvrindt y Smitz, 2002). Un buen modelo experimental, que permita extrapolar a la mujer los resultados de toxicología reproductiva en hembras, necesitaría una especie monovular, con actividad ovulatoria cíclica, cuyos ciclos tengan bien diferenciadas las fases luteal y folicular y con periodos de gestación y prepuberales largos, que permitan una exposición

prolongada a bajas dosis del producto en estudio; características que no presentan los roedores (Magnusson, 2005).

Los rumiantes constituyen un buen modelo experimental en el campo de la reproducción (Boerjan y col., 2002). En primer lugar, su fisiología reproductiva cumple las características señaladas. En segundo lugar, las técnicas de valoración de la actividad reproductiva (observaciones ultrasonográficas, endoscópicas, valoraciones hormonales, etc.) están bien definidas en estas especies y, de hecho, son utilizadas rutinariamente.

Entre los rumiantes, la oveja destaca como animal experimental por su tamaño y temperamento, que facilita su alojamiento en unidades experimentales y su manejo diario, y por sus características anatómicas y fisiológicas (Campbell y col., 2003; Bloch y col., 2005; Bordes y col., 2005; Denschlag y col., 2005). Por otro lado, las técnicas y protocolos de estudio y manejo de la reproducción, tanto por imagen como mediante determinaciones hormonales y celulares, están muy bien establecidas y contrastadas (Gonzalez-Bulnes y col., 2004).

2.4.1. Fisiología de la reproducción y endocrinología del ciclo sexual en la oveja

En la oveja, como en otros mamíferos, la actividad reproductiva se inicia con la pubertad y se caracteriza por la aparición de ciclos sexuales con desarrollo de folículos y ovulación. Estos ciclos se producen a lo largo de toda la vida del animal, excepto en los períodos de anestro (Saumande, 1991). Los procesos reproductivos están regulados por la actividad de los diferentes órganos secretores de hormonas que constituyen el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y entre los que existe una interacción o *feedback*, estimulante o inhibitorio que determina la actividad conjunta del eje.

El hipotálamo secreta la *hormona liberadora de gonadotropinas* (GnRH). Ésta actúa a nivel de la hipófisis anterior induciendo, por parte de ésta, la síntesis y liberación

de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), cruciales en el control de la actividad gonadal y la ciclicidad ovárica (Huirne y Lambalk, 2001). La hipófisis también produce hormona de crecimiento (GH), prolactina (PRL) y oxitocina.

La gonadotropina FSH estimula el crecimiento de los folículos ováricos y la LH es responsable de la maduración folicular preovulatoria y la ovulación. El patrón de secreción de FSH está controlado por un feedback negativo de las hormonas estradiol e inhibina procedentes de los folículos, mientras que la liberación de LH está controlada por un feedback positivo del estradiol procedente de los folículos y un feedback negativo por parte de la progesterona procedente del cuerpo lúteo; el cuerpo lúteo también secreta relaxina y oxitocina.

El útero secreta hormonas (prostaglandinas o PG) a nivel del endometrio. Las principales son la $PGF_{2\alpha}$, que induce la degeneración del cuerpo lúteo en animales no gestantes y la aparición de un nuevo ciclo sexual, y la PGE_2 , que tiene un efecto antiluteolítico. La acción luteolítica de la $PGF_{2\alpha}$ se debe a que provoca la contracción de los vasos sanguíneos originando isquemia en las células luteales, con la consiguiente necrosis celular y cese de la secreción de progesterona.

El ciclo sexual de la oveja tiene una duración media de 17 días y, en él, se diferencian dos fases, folicular y luteal. La fase folicular comprende desde la luteolisis hasta la ovulación y dura unos 2-3 días; las 30-36 horas previas a la ovulación corresponden al periodo de receptividad sexual. La fase luteal se prolonga durante 14-15 días tras la ovulación y se caracteriza por la formación de un cuerpo lúteo secretor de progesterona. En ambas fases existe una secuencia de cambios celulares en el ovario, interrelacionados con cambios endocrinos tanto a nivel orgánico como intraovárico; de tal forma que cada uno de ellos es causa, a su vez, de la aparición del siguiente de forma recurrente (Goodman y Hodgen, 1983). Y en ambas fases, folicular y luteal, existe un crecimiento continuo de folículos; el término dinámica folicular define los mecanismos de regulación y perfiles de

crecimiento de los folículos ováricos y las relaciones entre ellos; desde el estadio de folículo primordial hasta el de preovulatorio o hasta su atresia. La dinámica de crecimiento folicular determina el número de folículos que alcanzan el estadio preovulatorio y, posteriormente, la ovulación. La oveja se caracteriza por ser una hembra monovular; aunque con amplias variaciones y razas o genotipos que presentan tasas de ovulación mayores, entre 3 y 6 cuerpos lúteos.

El crecimiento folicular es dependiente de la liberación de FSH por parte de la hipófisis. La principal función de la FSH consiste en el *reclutamiento* de folículos para su entrada en crecimiento; en respuesta al estímulo de la FSH, los folículos crecen, se diferencian y comienzan a secretar estradiol 17- β e inhibina; estas hormonas ejercen un feedback negativo sobre la liberación de FSH por parte de la hipófisis. El descenso en la secreción de FSH por parte de la hipófisis induce la entrada en atresia de la mayoría de los folículos; es la fase denominada *selección*, en que el número de folículos en crecimiento se ajusta a la tasa de ovulación propia de la especie. Estos folículos alcanzan el estado de *dominancia*, en que secretan altas cantidades de estradiol e inhibina; y, con el fin de soslayar el déficit de FSH, cambian sus necesidades hacia LH. Si los niveles de LH son adecuados, proseguirán su desarrollo y alcanzarán la ovulación; en caso contrario, entrarán en atresia y, al disminuir los niveles de estradiol e inhibina, se iniciará una nueva onda de crecimiento folicular.

En la fase luteal del ciclo sexual, la formación y actividad de un cuerpo lúteo produce una elevación de las concentraciones plasmáticas de progesterona; los niveles de esta hormona alcanzan valores máximos a partir de, aproximadamente, seis días tras la ovulación. La progesterona induce un feedback negativo sobre la liberación de LH en la hipófisis y la LH se libera en forma de pulsos de escasa amplitud cada tres-diez horas. Por ello, los folículos dominantes entran en regresión durante la fase luteal.

En el momento en que se produce la luteolisis, los niveles de progesterona disminuyen y los pulsos de LH aumentan su frecuencia, pudiendo alcanzar una frecuencia de un pulso cada hora; este periodo coincide con el inicio de la fase folicular. Estos incrementos en la pulsatilidad de la LH provocan una estimulación del desarrollo folicular terminal y favorece los procesos de maduración folicular y oocitaria en los folículos preovulatorios. El folículo preovulatorio secreta altas cantidades de estradiol 17- β , y este incremento sostenido de los niveles de estradiol en sangre provoca la aparición de sintomatología de celo y, en coincidencia con el aumento de los niveles de LH, actúa a nivel de los receptores hipotalámicos provocando la descarga preovulatoria de LH por *feedback* positivo.

La descarga preovulatoria de LH aparece dos-seis horas después del comienzo del celo y dura aproximadamente ocho horas, siendo responsable de la maduración final del folículo preovulatorio, la ovulación y el inicio de la formación del cuerpo lúteo.

2.4.2. Foliculogénesis y dinámica folicular

El número de folículos que maduran durante la fase folicular, hasta alcanzar la ovulación, está determinado por el número de folículos que se desarrollan hasta adquirir el estado preovulatorio. A su vez, la dinámica de crecimiento de estos folículos está condicionada tanto por el desarrollo individual de cada folículo como por el equilibrio entre mecanismos de estimulación y de inhibición del crecimiento del conjunto de la población folicular; las relaciones con otros folículos. El desarrollo de un folículo y el número de folículos que se desarrollan desde el estado primordial hasta el preovulatorio y ovulatorio se encuentran influidos por numerosos factores endocrinos y ováricos que condicionan la continuación del crecimiento o entrada en atresia y con ello, la disponibilidad de folículos susceptibles de ovular a lo largo del ciclo sexual y la tasa de ovulación de una hembra.

A. Crecimiento y desarrollo folicular individual

Se denomina foliculogénesis al proceso por el cual los folículos ováricos se desarrollan desde el estadio de folículo primordial hasta la atresia o la ovulación. Es un proceso continuo, cuya duración en la oveja fue establecida en aproximadamente seis meses (Cahill y Mauleon, 1980). Se diferencian dos fases principales, en función del papel que desempeñan las gonadotropinas FSH y LH; fase de crecimiento folicular basal y fase de crecimiento folicular tónico.

Fase de crecimiento folicular basal

En esta etapa, los folículos primordiales -detenidos en profase meiótica durante el desarrollo fetal- reanudan su crecimiento hasta el estadio de folículo preantral o secundario temprano (en que todavía no existe una cavidad central o *antrum*).

El folículo primordial presenta un oocito, sin zona pelúcida y rodeado de una lámina basal y una sola capa de células epiteliales planas precursoras de la capa granulosa. En su evolución a folículo primario aparece la zona pelúcida y las células de la granulosa cambian de escamosas aplanadas a cúbicas. Este crecimiento está influido por dos hormonas intraováricas, el estradiol y la testosterona, para las cuales aparecen receptores en fases muy tempranas del folículo primario; también afectarían factores como el Factor de Crecimiento del tipo de la Insulina (IGF) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). En una fase posterior, aparece la capa de células de la teca, que permite la exposición del folículo a FSH y LH al presentar receptores para ambas.

Fase de crecimiento folicular tónico.

En esta etapa se produce el desarrollo desde el folículo preantral hasta el estadio de folículo antral, pudiendo llegar a ovular. En la actualidad, los folículos antrales se clasifican como gonadotropo-receptivos (crecen en respuesta a aumentos en los

niveles de gonadotropina FSH, pero no es indispensable para su crecimiento) y gonadotropo-dependientes (dependen de la FSH para su crecimiento y entran en atresia cuando se ven privados de esta hormona); en el caso de la oveja, estos últimos tendrían un tamaño superior a 3 mm (González-Bulnes y col., 2002).

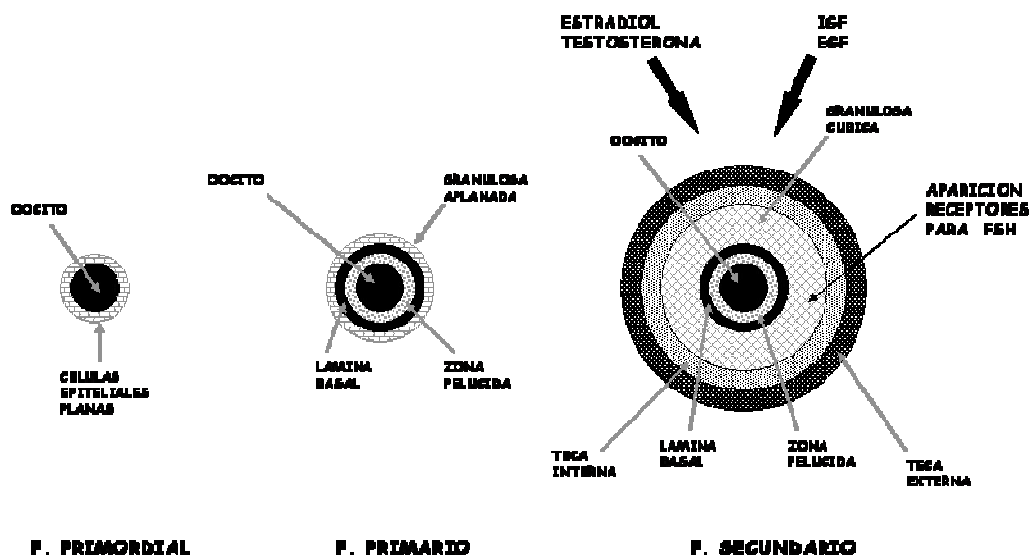


Figura 2.3. Representación esquemática de la evolución morfológica y funcional del folículo durante la fase de crecimiento basal.

Los folículos secundarios liberan estrógenos como consecuencia de la actividad conjunta de las células de la capa granulosa y la teca interna, estimuladas por la LH y FSH (Armstrong y Papkoff, 1976). En primer lugar, las células de la teca interna se diferencian por la acción de la LH (Fortune y Kirk, 1988) y, estimuladas por esta hormona, secretan andrógenos; principalmente androstenodiona. En segundo lugar, las células de la granulosa, estimuladas por la FSH, adquieren capacidad enzimática tipo aromatasa que les permite convertir los andrógenos en estrógenos. La FSH, además, induce la formación, en las células de la granulosa, de receptores para LH, prolactina y prostaglandinas. Las células de la granulosa comienzan a tener receptores para LH en el folículo secundario (2,5 mm en la oveja; McNeilly y col., 1986, 1991), y el número y sensibilidad de éstos van aumentando hasta ser máximos en el folículo preovulatorio.

En ese momento, los folículos secundarios entran en el proceso de **selección** que conduce a la diferenciación de un folículo terciario susceptible de ovular. El folículo terciario se caracteriza por la existencia de gran cantidad de receptores para LH, tanto en teca como en granulosa (Webb y England, 1982), que son necesarios para la maduración final y la formación del/los folículo(s) preovulatorio(s) en respuesta al incremento de los pulsos de LH que se produce en la fase folicular. Los receptores de LH son también necesarios para alcanzar la ovulación en caso de que se produzca la descarga preovulatoria de LH tras la luteolisis.

Una vez finalizado el periodo de selección, cuando uno o varios folículos alcanzan un mayor tamaño y desarrollo que el resto, se produce el efecto de **dominancia**; éste es debido a la dependencia de FSH que muestran los folículos antrales para su crecimiento. Los folículos de tamaño preovulatorio secretan altos niveles de inhibina y estradiol, dado que tienen una mayor actividad aromatasas; en realidad, el/los folículo(s) seleccionado(s) produce(n) la mayor parte del estradiol circulante (Ireland y col., 1983); con lo que disminuyen los niveles de FSH y causan la atresia de los folículos menores (Zelevnik y Hillier, 1984). Los folículos que alcanzan el estado de dominancia evitarían su propia entrada en atresia cambiando sus necesidades de FSH hacia LH; en respuesta a la cual crecen y maduran hasta el estadio ovulatorio (Campbell y col., 1995). Por el contrario, los folículos con menor desarrollo (Martin y col., 1988) se ven perjudicados ya que, ni tienen bastante FSH, ni pueden aprovechar la LH al no tener aún suficientes receptores para ella.

En la fase folicular, la desaparición del cuerpo lúteo provoca el descenso de los niveles de progesterona y el aumento de los niveles de LH; es el momento en que la dominancia puede ser establecida. Sin embargo, durante la fase luteal, los niveles de LH permanecen bajos debido al efecto inhibitorio de la progesterona y los folículos preovulatorios no tienen oportunidad de establecer su dominancia. Estos folículos comienzan a producir menos estrógenos (Uilenbroek y col., 1980), entrarán en atresia por disminución tanto de la funcionalidad de los receptores de

la LH como del número de células de la granulosa (Ireland y Roche, 1983) y serán sustituidos por otros folículos de sus características.

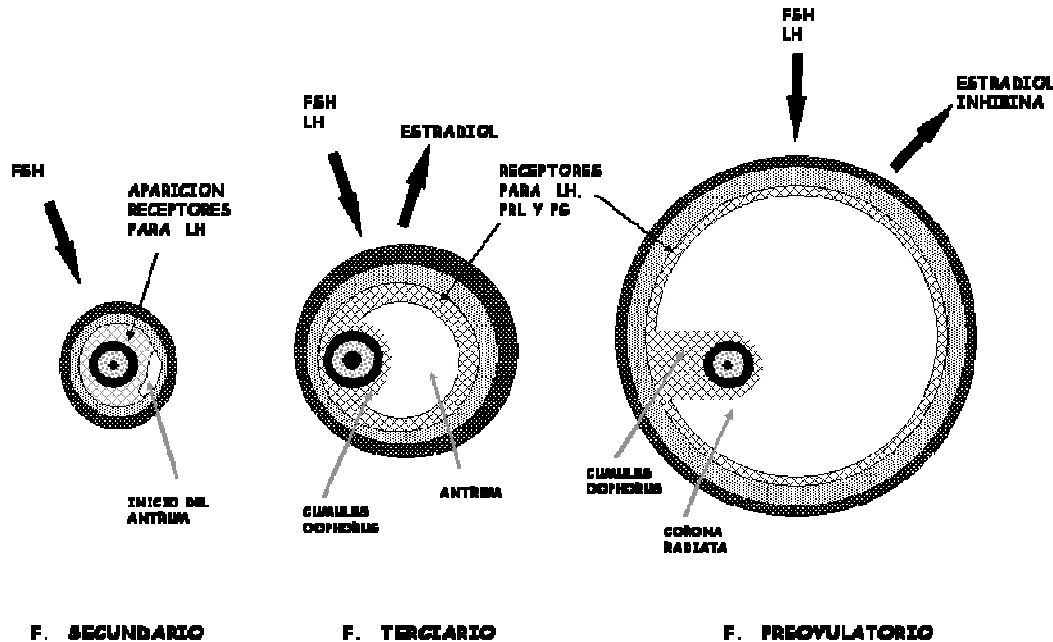


Figura 2.4. Representación esquemática de la evolución morfológica y funcional del folículo durante la fase de crecimiento tónico.

La secreción de estradiol, además de como mecanismo de inhibición hacia otros folículos, permite al folículo dominante mantenerse libre de atresia; ya que los folículos con alta concentración de estradiol en su *antrum* tienen mayor sensibilidad de sus receptores hacia FSH y pueden aprovechar la poca FSH circulante (Ireland y Roche, 1982; McNeilly, 1991; Campbell y col., 1995).

B. Dinámica de la población folicular

Los estudios de dinámica folicular del ciclo sexual en pequeños rumiantes fueron realizados mediante ultrasonografía en ovejas con ovulación múltiple (Schrick y col., 1993), y mostraron que la entrada de los folículos en la fase de crecimiento terminal se produce de forma continua. Algunos de estos folículos alcanzan el tamaño preovulatorio, aunque no llegan a ovular, tanto durante la fase folicular como

durante la fase luteal (Ravindra y col., 1994). En estos primeros estudios ultrasonográficos no se encontraron evidencias que sostuvieran que el desarrollo folicular en la oveja se presentaba en ondas (Schrick y col., 1993; Ravindra y col., 1994; López Sebastián y col., 1997). Sin embargo, otros estudios provenientes de diferentes laboratorios (Ginther y col., 1995; Bartlewsky y col., 1999; Leyva y col., 1999; Viñoles y col., 1999; Evans y col., 2000, 2003) señalan que la emergencia de los folículos que crecen desde 3 hasta 5 mm ocurre en ondas de crecimiento, que varían entre 2 y 4 durante el ciclo sexual. En la actualidad, se han armonizado ambas posturas sobre la base de la existencia de ondas primarias y secundarias (Adams, 1999; Evans y col., 2000, 2003).

2.4.3. Ovulación, luteinización y función luteal

Una vez que uno o varios folículos alcanzan la ovulación se produce la formación del/los cuerpo(s) lúteo(s). El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina temporal que se desarrolla a partir del folículo ovulado mediante el proceso denominado luteinización. La función principal del CL es la secreción de progesterona para la implantación del blastocisto y el mantenimiento de la gestación (Niswender y col., 1985; Keyes y Wiltbank, 1988; Reynolds y col., 1994); además, el CL secreta, en pequeñas cantidades, péptidos como relaxina, oxitocina, vasopresina e inhibina (Field, 1991). En caso de que no se produzca la gestación, el CL sufre una regresión o luteolisis, con lo que disminuyen las concentraciones plasmáticas de progesterona, aumenta la frecuencia de pulsatilidad de secreción de LH y se produce una nueva ovulación (Niswender y col., 1994; Meidan y col., 2005).

En el proceso de luteinización se produce la transición del folículo preovulatorio a un cuerpo lúteo altamente vascularizado capaz de secretar progesterona. Los procesos clave durante la luteinización son la diferenciación de las células luteales para producir progesterona (Smith y col., 1994; Wiltbank, 1994) y la generación de nuevos vasos sanguíneos, a partir de los ya existentes, para aumentar el flujo en las células luteales (angiogénesis; Davis y col., 2003; Fraser y Wulf, 2003; Meidan y col.,

2005). En realidad, el cuerpo lúteo está constituido por cuatro tipos celulares: fibroblastos, células endoteliales (Farin y col., 1989; Reynolds y col., 1994; Niswender y col., 2000; Berisha y Schams, 2005) y células esteroidogénicas luteales grandes y pequeñas, que derivan de las células de granulosa y teca, respectivamente (Meidan y col., 1990; Niswender y col., 1994). Para ello, las células de granulosa y teca sufren hiperplasia, hipertrofia y/o migración (Smith y col., 1994; Niswender y col., 2000).

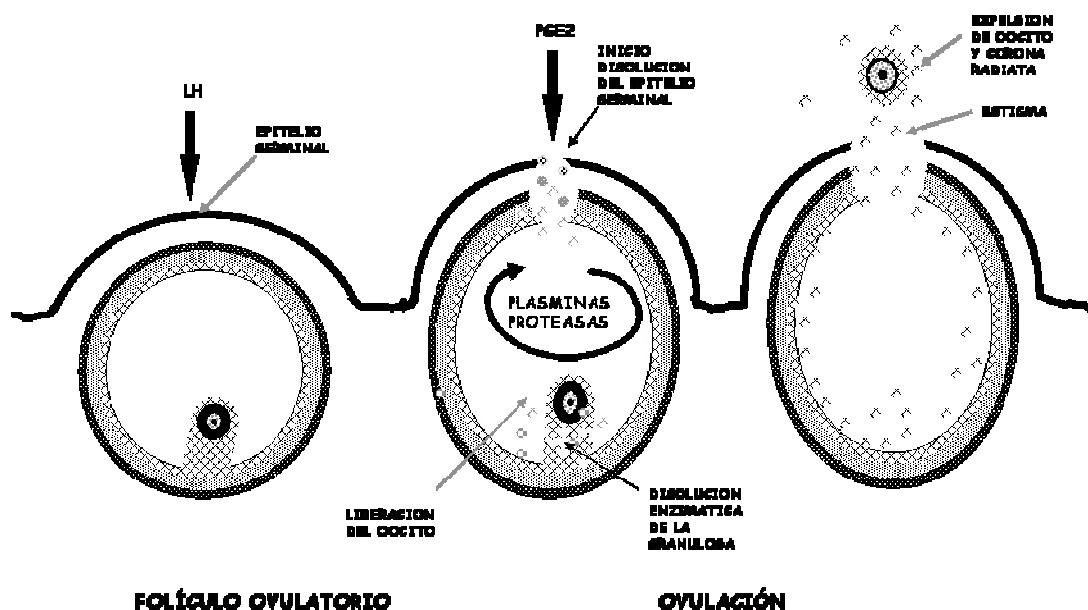


Figura 2.5. Representación esquemática de los cambios morfológicos y mecanismos endocrinos y enzimáticos en la ovulación.

A. Diferenciación de las células luteales y angiogénesis

Los primeros signos de luteinización ocurren, en realidad, antes de la ovulación, en respuesta al incremento de los niveles de LH en sangre durante el pico preovulatorio (Niswender y col., 1994). El incremento de LH induce una reorganización de las células de granulosa y teca (Niswender y col., 1994; Schams y Berisha, 2004) y su diferenciación en células luteales (Wiltbank, 1994). Este cambio altera las vías esteroidogénicas, pasando a ser ahora la progesterona la hormona esteroidea producida por ambos tipos celulares; el proceso de diferenciación celular

conlleva cambios en la expresión y regulación de las enzimas esteroideogénicas (Payne y Hales, 2004) necesarias para producir progesterona. Principalmente, se incrementa la expresión de enzimas necesarias para convertir colesterol a pregnenolona (P450_{scc}) y pregnenolona a progesterona (3 α HSD-17 β -DHS-hidroxiesteroide-deshidrogenasa).

El crecimiento y función del CL depende prácticamente del desarrollo vascular; siendo éste a su vez dependiente de factores angiogénicos. Entre ellos, los principales son el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF), siendo este último el de mayor importancia sobre el desarrollo vascular del CL. De igual forma, las uniones *gap*, que establecen comunicaciones entre las células luteales grandes y pequeñas, están también involucradas en el desarrollo y funcionamiento (esteroideogénesis) del CL, ya que se ha demostrado una relación entre la producción de P4 y el número de estas uniones *gap* (Reynolds y col., 1992, 1994; Redmer y Reynolds, 1996; Grazul-Bliska y col., 1997, 1998; Borowczyk y col., 2007).

El desarrollo de capilares a partir de los vasos sanguíneos preexistentes es esencial para la formación y función del CL (Stocco y col., 2007). Estos capilares permiten a las células luteales la captación de oxígeno, nutrientes y precursores hormonales necesarios para sintetizar y liberar progesterona (Fraser y Wulff, 2003).

El folículo de De Graaf tiene una lámina basal que separa el interior del folículo avascular de la red profusa de vasos sanguíneos de la teca interna (Keyes y Wiltbank, 1988). En el momento de la ovulación, esta lámina se rompe y los vasos sanguíneos invaden el espacio antral folicular, creando una extensa red vascular de nuevos vasos sinusoidales (Niswender y col., 1994), claves para el crecimiento del tejido luteal (Berisha y Schams, 2005; Davis y col., 2003; Kaczmarek y col., 2005). En este proceso, han sido identificados promotores de angiogénesis (Berisha y Schams, 2005); los más importantes parecen ser VEGF, determinante de la angiogénesis en el CL (Schams y Berisha, 2002), FGF y el factor de crecimiento tipo Insulina (IGF).

B. Desarrollo y función luteal

El desarrollo del CL depende de factores genéricos (especie y raza, relacionados con el tamaño corporal) y locales (tasa de ovulación); el peso del CL está relacionado positivamente con el tamaño corporal en las diferentes especies de mamíferos, pero existe una relación inversa entre el tamaño del CL y número de CLs (Reynolds y col., 1994)

El mantenimiento de la función luteal se debe principalmente a la acción de la LH y la hormona de crecimiento; sin embargo, existen otras sustancias involucradas, tales como el IGF-I y las prostaglandinas PGE₂ y PGI₂, que también incrementan la producción de P4 (Juengel y Niswender, 1999). La respuesta de las células luteales al estímulo gonadotrópico depende de la cantidad de receptores de LH que éstas tengan (Greenwald, 1999). En ovejas, el mayor número de receptores activos de LH están localizados sobre las células luteales pequeñas, aunque las células luteales grandes de ovejas cíclicas y en anestro también contienen sitios de unión a LH (Harrison y col., 1987). Ambos tipos celulares producen progesterona, aunque la producción basal es más alta en las células grandes (Fitz y col., 1982; Harrison y col., 1987), ya que constituye aproximadamente el 80% de la progesterona secretada (Niswender y col., 1985).

La producción de progesterona por unidad de tejido funcional, por célula, es similar en las etapas iniciales y avanzadas de crecimiento del CL. Esto sugiere que las menores concentraciones sistémicas de progesterona correspondientes a la etapa inicial de formación y crecimiento del tejido luteal se deben más a una menor cantidad de tejido luteal y a una baja vascularización que a una reducida capacidad de producir progesterona *per se* (Reynolds y col., 1994).

C. Luteolisis

En caso de que no se establezca la gestación, se inician los procesos que conducen a la lisis del CL. En primer lugar, por la acción de la prostaglandina $PGF_{2\alpha}$, que se sintetiza y libera en el endometrio uterino. La producción de $PGF_{2\alpha}$ es, a su vez, inducida por la oxitocina sintetizada por el CL, que ejerce su acción a través de receptores localizados a nivel del endometrio materno (Wathes y Lamming, 1995). El mecanismo de acción de la $PGF_{2\alpha}$ se basa, por una parte, en una reducción del flujo vascular (Niswender y Nett, 1994), y por otra, en una disminución de la producción de progesterona a través de la acción de segundos mensajeros (principalmente, de la proteinquinasa C; Wiltbank y col., 1991). Esta disminución de la esteroidogénesis se produce por interrupción del mecanismo de transporte del colesterol, hacia y a través de la mitocondria, y mediante una disminución del ARNm que codifica la 17 β - dihidroxilasa (17 β -DHS; Juengel y Niswender 1999).

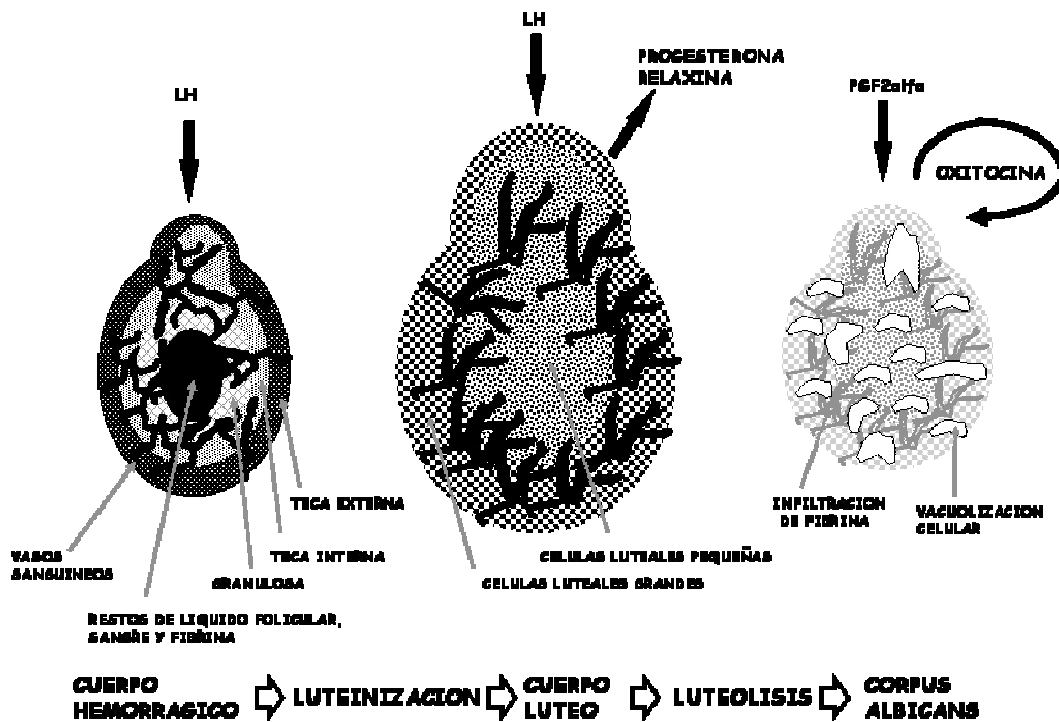


Figura 2.6. Representación esquemática de los cambios morfológicos y funcionales durante la evolución del cuerpo lúteo.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Animales

El trabajo experimental desarrollado en la presente Memoria fue sometido a evaluación y aceptado por el Comité Ético de Experimentación Animal del INIA (Informe CEEA 013/2006, de 24 de julio de 2006) y se realizó en consonancia con la normativa española RD 1201/05 y la Directiva de la Unión Europea 86/609 sobre protección en el uso de animales de experimentación.

En su desarrollo se han utilizado un total de 325 ovejas (259 de raza Manchega y sus cruces, 35 de raza Rubia del Molar y 31 de raza Negra Colmenareña), entre 2 y 7 años de edad; vacunadas, desparasitadas y sin antecedentes de patologías. Estas hembras estaban ubicadas en la granja experimental del Departamento de Reproducción Animal del INIA, centro autorizado por el Ministerio de Agricultura para la utilización de animales con fines científicos, y en la granja de la cooperativa Campo Real, en la que se realizó exclusivamente un muestreo sanguíneo; ambas se encuentran en la provincia de Madrid, en una latitud de 40° N. Todos los experimentos fueron desarrollados en época de estación reproductiva y los animales se mantuvieron en régimen de estabulación, en parques con acceso al exterior, con exposición a condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo.

3.1. OBJETIVO 1. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE DEHP EN OVEJAS SIN EXPOSICIÓN EXPERIMENTAL

Animales y toma de datos

El estudio engloba un total de 251 ovejas, todas ellas hembras, utilizadas en dos experimentos consecutivos. En una primera prueba se analizaron 150 muestras de animales de diferentes razas (84 Manchegas, 35 Rubias del Molar y 31 Negras Colmenareñas), edades (2 a 7 años) y estatus reproductivo (15 preñadas y 135 no preñadas). En el segundo experimento, diseñado en base a los resultados obtenidos en el primero para confirmar los posibles efectos de la gestación sobre los niveles plasmáticos de DEHP, se utilizaron 101 ovejas, nacidas y criadas en una granja diferente, todas ellas de la misma raza (Manchega x Assaf) y edad (4 a 5 años), pero diferente estatus reproductivo; treinta y dos preñadas, 37 vacías y 32 recién paridas (menos de un mes antes de la toma de sangre).

En todos estos animales se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular (5 ml) mediante tubos heparinizados para extracción de sangre (Vacutainer™ Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, France). Las muestras de sangre eran inmediatamente centrifugadas a 2000 x g durante 15 minutos y el plasma fue almacenado en tubos de cristal a -20 °C hasta su análisis; la cuantificación de la concentración de DEHP en estas muestras se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), utilizando el método descrito en el Anexo I.

Análisis de los datos

Los posibles efectos del genotipo, edad y estado reproductivo sobre la presencia y niveles de DEHP fueron determinados mediante análisis de varianza (ANOVA). El análisis estadístico de los resultados expresados en porcentajes era realizado tras la transformación al arcoseno de los valores para cada porcentaje individual. Todos

los valores de DEHP eran expresados como media \pm ESM y las diferencias entre concentraciones y porcentajes eran consideradas estadísticamente significativas para $P < 0,05$.

Resultados

En el primer experimento, se detectó DEHP en el 34,7% de las muestras, con una concentración plasmática media de $0,45 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ (rango= $0,05\text{-}2,81 \mu\text{g/ml}$).

El principal factor que afectaba a las concentraciones plasmáticas de DEHP fue el estatus reproductivo (Tabla 3.1). Así, todas las ovejas preñadas (100%) mostraron presencia de DEHP, con niveles plasmáticos medios mayores que las hembras no gestantes ($1,42 \pm 0,18$ vs $0,16 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$; $P < 0,0001$); en estas últimas, sólo se detectó DEHP en el 27,4% de los animales.

Tabla 3.1. Primer experimento; incidencia y concentraciones plasmáticas de DEHP.

	n	Incidencia ([DEHP]>28 ng/ml)		[DEHP] ($\mu\text{g/ml}$)	
		n	%	Rango	Media \pm DS
Preñadas	15	15	100	0,87 – 2,81	1,42 \pm 0,18**
No Preñadas	135	37	27.4	0,05 – 0,41	0,16 \pm 0,01**
< 4 años	69	12	17,4*	0,05 – 0,38	0,16 \pm 0,02
> 4 años	66	25	37,9*	0,07 – 0,41	0,16 \pm 0,01
TOTAL	150	52	34,7	0,05 – 2,81	0,45 \pm 0,01

*Diferencia significativa $P < 0,05$

**Diferencia $P < 0,0001$

En los animales no gestantes, no se encontraron efectos significativos del genotipo sobre las concentraciones plasmáticas de DEHP. Sin embargo, sí se encontró un efecto significativo de la edad (Tabla 3.1); el porcentaje de animales con trazas de DEHP era mayor en ovejas no gestantes mayores de 4 años ($n = 66$; 37,9%) en comparación con las más jóvenes ($n = 69$; 17,4%; $P < 0,05$), aunque los niveles medios de concentración del ftalato eran similares ($0,16 \pm 0,01$ vs $0,16 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$).

En los resultados obtenidos en el segundo experimento, se confirma la influencia de la gestación sobre los niveles de DEHP (Tabla 3.2). El porcentaje de animales con presencia de DEHP era mayor en ovejas preñadas (71,9%) que en vacías (35,1%; $P < 0,005$) o en las que habían parido recientemente (21,9%; $P < 0,005$), como se detalla en la Tabla 3.2; sin embargo, los niveles plasmáticos medios de DEHP eran similares entre los tres grupos ($0,42 \pm 0,02$; $0,33 \pm 0,02$ y $0,34 \pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$, respectivamente).

Tabla 3.2. Segundo experimento; incidencia y concentraciones plasmáticas de DEHP.

	n	Incidencia ([DEHP]>28 ng/ml)		[DEHP] ($\mu\text{g/ml}$)	
		n	%	Rango	Media \pm DS
Preñadas	32	23	71,9*	0,24 – 0,57	$0,42 \pm 0,02$
No Preñadas	37	13	35,1*	0,21 – 0,46	$0,33 \pm 0,02$
Parto reciente	32	7	21,9*	0,22 – 0,51	$0,34 \pm 0,05$
TOTAL	101	43	42,6	0,21 – 0,57	$0,38 \pm 0,02$

*Diferencia significativa $P < 0,005$

Discusión

Los resultados que se presentan, basados en datos obtenidos en más de 250 individuos seleccionados aleatoriamente, indican que alrededor de la mitad de las ovejas del estudio mostraron niveles cuantificables de DEHP. Este estudio indica que el número de animales con presencia de DEHP en plasma aumenta con el rango de edad, lo cual puede estar relacionado con un periodo prolongado de exposición. Sin embargo, el factor crucial fue la gestación. Todas las ovejas preñadas mostraron evidencias de DEHP en plasma, lo cual es crítico desde un punto de vista epidemiológico; aún más si los hallazgos son extrapolados a humanos.

Los estudios de niveles plasmáticos no inducidos experimentalmente en animales y humanos son escasos; así, no hay estudios previos de referencia en animales de

granja. En el experimento que presentamos, la tasa media de ovejas con niveles detectables de DEHP (35,1%) era similar al recientemente descrito para la mujer (47,2%; Högberg y col., 2008). Tanto en este estudio como en el nuestro, se han utilizado los valores de los niveles plasmáticos de DEHP como un índice fiable de la exposición al ftalato y de posibles efectos adversos en la salud; como indicaron Koo y Lee (2005). La evaluación de los niveles de mono-ésteres de ftalato, principalmente en orina, es la técnica comúnmente utilizada para la valoración de la exposición a estos compuestos (Heudorf y col., 2007); sin embargo, algunos autores postulan que la evaluación de di-ésteres sería más adecuada para evitar errores de estimación causados por las diferencias individuales en el metabolismo de di- a monoésteres (Koo y Lee, 2005; Anderson y col., 2001); como hemos realizado en este trabajo. Además, el estudio de Högberg y col. (2008) no encontró correlaciones entre las concentraciones de metabolitos de ftalatos en orina y leche o sangre, por lo que no se podían estimar los niveles plasmáticos a partir de los obtenidos en otros emuntorios. Finalmente, debe considerarse que, en la oveja, la evaluación de la exposición a ftalatos por medición de los niveles de metabolitos urinarios es limitada por el desconocimiento de, primero, los procesos del metabolismo de ftalatos en esta especie y, segundo, por la variabilidad temporal individual de los niveles de metabolitos descritos para otras especies (Fromme y col., 2007).

Si bien los porcentajes de individuos que mostraron concentraciones detectables de DEHP fueron similares entre las ovejas de nuestro estudio y las mujeres del estudio de Högberg y col., (2008), los niveles plasmáticos medios fueron mayores en las ovejas (330 ng/ml) que en mujeres (5,9 ng/ml). En un primer momento, estas diferencias podrían relacionarse con diferentes fuentes y niveles de exposición entre animales y humanos. Las personas están expuestas, tanto en el trabajo como en el hogar, por la inhalación de polvo, la ingestión de alimentos conservados en recipientes plásticos, por exposición dérmica a ropas y cosméticos y por el uso de material médico. Las ovejas estarían expuestas, principalmente, a través de la ingestión de agua, suelos y pastos contaminados (Rhind y col., 2005); así, la presencia de ftalatos ha sido detectada en numerosos medios, incluyendo aire,

suelo, sedimentos y aguas residuales o naturales como resultado de la producción, uso y desecho de plásticos (Liang y col., 2008). Los ftalatos pueden ser degradados por bacterias y hongos, ya sea en condiciones aerobias, anaerobias o anóxicas y, debido a sus propiedades químicas, la exposición a ftalatos no resulta en bioacumulación; sin embargo, las concentraciones medioambientales están aumentando y la aparición de riesgos sanitarios no puede ser subestimada (Heudorf y col., 2007). En este escenario, el seguimiento de la exposición humana a DEHP a causa del consumo de productos animales es esencial en estudios sanitarios (Calafat y McKee, 2006b; Latini, 2007).

En el presente estudio, el porcentaje de animales que mostraban presencia de DEHP en plasma aumentó con la edad, lo que puede relacionarse con un mayor periodo de exposición a ftalatos en el alimento. Sin embargo, existen estudios previos que sugieren que la magnitud de la acumulación de ftalatos en los tejidos corporales no es solamente dependiente del tiempo de exposición; otros factores podrían afectar a los niveles de DEHP en sangre y otros tejidos, como diferencias en la composición de la dieta, en el comportamiento toxicocinético o en la movilización de los depósitos grasos como consecuencia de gestaciones y lactancias previas (Rhind y col., 2005). Esta última hipótesis se ve reforzada por nuestros resultados.

En este estudio, todas las ovejas preñadas del primer experimento mostraron evidencias de DEHP en plasma, posiblemente debido a su liberación desde los depósitos grasos durante este periodo de requerimientos energéticos elevados, de acuerdo con los trabajos previos de Rhind y col. (2005). El DEHP tiende a acumularse en músculo e hígado; sin embargo, debido a su alta liposolubilidad, la acumulación más importante se encuentra en el tejido adiposo, de donde es movilizado en caso de demanda metabólica de los depósitos grasos. Este hecho es especialmente preocupante, ya que la exposición a DEHP podría inducir toxicidad en procesos reproductivos y del desarrollo, como se ha estudiado en modelos murinos (Crain y col., 2008). Además, en trabajos previos se sugería que las moléculas circulantes de DEHP pueden cruzar la barrera placentaria y afectar al feto

induciendo efectos teratogénicos (Silva y col., 2004); este punto resulta de gran relevancia y repercusión en Salud Pública. Los resultados de recientes estudios *in vivo* e *in vitro* indican que la exposición a ftalatos produce alteraciones en la implantación (Matsumoto y col., 2008), confirmando estudios previos que señalan la gestación temprana (primer trimestre de la gestación) como un periodo crítico para la exposición y toxicidad de los ftalatos (Tickner y col., 2001). Sin embargo, los mecanismos que afectarían al desarrollo embrionario –efectos directos sobre el embrión y/o indirectos a través de la barrera placentaria- aún no han sido clarificados (Xu y col., 2008).

Un segundo periodo crítico en la exposición a compuestos disruptores endocrinos, junto al periodo de implantación, coincide con el último tercio de la gestación y comprende el final de la organogénesis y del desarrollo fetal. En este periodo, la actividad y, con ello, la sensibilidad de los tejidos fetales y la placenta materna están aumentados (Crain y col., 2008). Pero, aún más, tanto durante el final de gestación como justo antes del nacimiento, los depósitos adiposos mamarios son movilizados por las necesidades del crecimiento final del feto y la producción de leche; lo que, previsiblemente, aumenta los niveles plasmáticos circulantes de DEHP, como sucede en el presente estudio.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio reflejan una elevada incidencia de ovejas que presentan acumulación de DEHP. El porcentaje de animales con presencia de este ftalato aumentaba por efecto de la edad, debido a un mayor periodo de exposición, y, principalmente, de la gestación, debido a la movilización de las reservas corporales.

3.2. OBJETIVO 2. ESTUDIO CINÉTICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DEHP EN OVEJAS Y ESTABLECIMIENTO DEL MODELO EXPERIMENTAL

Animales y toma de datos

Este estudio se compone de tres experimentos consecutivos, en los que se han utilizado un total de 24 ovejas adultas, entre 4 y 7 años. Los animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos de 8 animales. En el primer estudio se valoró la cinética del DEHP tras la administración, en la vena yugular derecha, de una única dosis intravenosa de 25 mg/kg de peso vivo del ingrediente activo (Sigma-Aldrich, Madrid, España). El segundo estudio tenía como objetivo la valoración de la cinética de DEHP tras la administración de la misma cantidad de producto, pero en una única dosis intramuscular profunda; en el músculo semitendinoso de la extremidad posterior derecha. En el tercer estudio se evaluó la cinética de DEHP tras la administración de dosis múltiples seriadas de 25 mg/kg de peso vivo, por vía intramuscular profunda, tres veces a la semana durante dos meses; posteriormente, se llevó a cabo la administración de dosis de 50 mg/kg peso vivo, con el mismo protocolo durante otros dos meses.

En el primer y segundo experimentos, la determinación de las concentraciones plasmáticas de DEHP se realizó sobre muestras de sangre obtenidas de la vena yugular izquierda, a los 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos, a las 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas y en los días 2, 4, 6, 8, 15, 22 y 29 después de la administración de DEHP. En el tercer experimento, el muestreo sanguíneo se realizó tres veces por semana durante el periodo de administración de DEHP; inmediatamente antes de cada dosis. Las muestras de sangre (5 ml) se obtuvieron mediante tubos heparinizados para extracción de sangre (Vacutainer™ Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, France). Una vez obtenidas, estas muestras eran inmediatamente centrifugadas a 2000 x g durante 15 minutos para separar el plasma, que fue almacenado a -20 °C hasta su análisis. La determinación de la concentración de

DEHP en las muestras plasmáticas se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), según el método descrito en el Anexo I.

Análisis de los datos

En los dos primeros experimentos, tras llevar a cabo la corrección de las concentraciones plasmáticas de DEHP por substracción de los niveles basales antes de la administración del compuesto, la valoración de las concentraciones experimentales de DEHP a lo largo del tiempo fue realizada utilizando un paquete informático comercial (PKCALC; Schumaker, 1986). Los parámetros cinéticos fueron calculados mediante análisis no compartimental de forma individual para cada animal, aunque son presentados como la media de las 8 ovejas. La biodisponibilidad intramuscular fue calculada dividiendo el área bajo la curva (AUC) de la administración intramuscular por el AUC de la administración intravenosa. Estos últimos parámetros se calcularon mediante el método simple promedio de datos (NAD ó Naïve Averaging of Data), donde la concentración plasmática media del total de los individuos para cada momento de muestreo fue utilizada para calcular los AUC tanto tras la administración intravenosa (AUC_{iv}) como la intramuscular (AUC_{im}), de acuerdo con Gibaldi y Perrier (1982).

Las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) y el tiempo en el que se alcanzan (t_{max}) fueron extrapolados directamente de los datos de concentración respecto al tiempo. Mediante modelización no compartimental se estimaron los valores del área bajo la curva y el momento del área bajo la curva concentración/tiempo desde 0 a infinito (AUC_{inf} y $AUCM_{inf}$), el aclaramiento total (Cl), el volumen aparente de distribución (Vd) y la semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$). El tiempo medio de residencia (MRT) fue calculado dividiendo AUC por AUMC.

En el tercer experimento, los parámetros cinéticos fueron calculados de igual manera que en los dos primeros ensayos; estimándose, asimismo, el rango y la media de las concentraciones mínimas en equilibrio (C_{SSmin}) y el área bajo la curva

desde la primera a la última toma (AUC_{last}). Los valores de las concentraciones plasmáticas de DEHP y de los parámetros toxicocinéticos calculados individualmente eran expresados como media \pm ESM.

Resultados

La disposición de DEHP tras la administración de una única dosis intravenosa se caracterizó por una alta variabilidad individual. En general, los niveles plasmáticos de DEHP tras la administración endovenosa presentaron una elevación inicial de pequeña entidad ($0,69 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$; $t= 5 \text{ min}$); inmediatamente después, se observa un descenso de los niveles plasmáticos, seguido de un nivel de concentración sostenido en el que se aprecian 2-3 picos plasmáticos distribuidos dentro de las primeras 24 horas post-administración (Figura 3.1). Posteriormente, las concentraciones de ftalato se mantienen por encima de los niveles basales ($0,18 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$) durante 20 días en todos los individuos y, en algunos de ellos ($n= 6$), durante más de 30 días. El perfil plasmático se caracterizaba por la aparición de picos de DEHP en plasma durante todo el periodo de estudio (media: 6 y 12 h y 2 y 6 d); los valores medios de estos incrementos variaban entre 0,73 y 1,15 $\mu\text{g/ml}$. El aclaramiento resultó en $12,63 \pm 3,82 \text{ ml/min/kg}$, el volumen de distribución, $31,4 \pm 8,7 \text{ l/kg}$ y el MRT, $87,52 \pm 26,17 \text{ h}$ (Tabla 3.3).

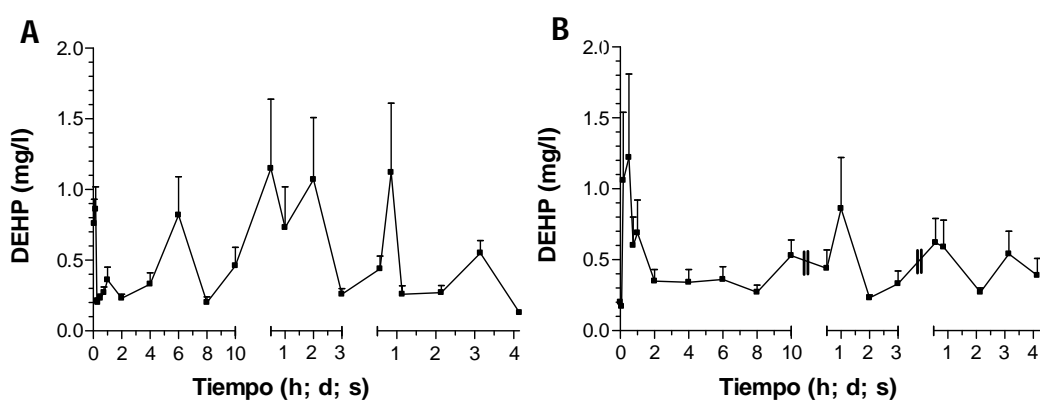


Figura 3.1. Concentraciones plasmáticas de DEHP (media \pm ESM) *versus* tiempo tras la administración de dosis únicas intravenosa (A) e intramuscular (B) de 25 mg/kg de DEHP en ovejas.

Tras la administración de una única dosis intramuscular de DEHP se produjo una buena absorción del compuesto ($C_{max} = 1,34 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$, $t_{max} = 15,00 \pm 2,16 \text{ min}$ y $F = 78,96\%$; Tabla 3.3). Posteriormente, de manera similar a la administración intravenosa, la concentración de DEHP disminuyó hasta unos niveles estables, superiores a los basales y se mantuvo (con un valor medio de $0,24 \mu\text{g/ml}$) durante 20 días en todas las ovejas y durante más de 30 días en algunas de ellas ($n = 5$); ninguno de los individuos mostró concentraciones de DEHP por encima de los valores basales tras 45 días. El perfil plasmático presentó, al igual que tras la administración endovenosa, picos de DEHP (media: 24 h y 4-6 d) con valores medios entre $0,78$ y $0,59 \mu\text{g/ml}$ (Figura 3.1).

Tabla 3.3. Parámetros farmacocinéticos (media \pm ESM) tras administración de dosis única intravenosa e intramuscular (25 mg/kg) en oveja.

		DOSIS UNICA(25 mg/kg)	
		Intravenosa	Intramuscular
C_{max}	($\mu\text{g/ml}$)	-	$1,34 \pm 0,45$
t_{max}	(min)	-	$15,0 \pm 2,2$
t_{½ab}	(min)	-	$10,8 \pm 2,5$
t_{½el}	(h)	$60,2 \pm 19,2$	-
Cl	(ml/min/kg)	$12,6 \pm 3,8$	-
Vd	(l/kg)	$31,4 \pm 8,7$	-
AUC	($\mu\text{g min/ml}$)	1966 ± 348	1555 ± 435
MRT	(h)	$87,5 \pm 26,2$	$105,7 \pm 7,2$
F	(%)	-	78,96

C_{max} : concentración plasmática máxima; t_{max} : tiempo para la máxima concentración plasmática; $t_{½ab}$: semivida de absorción; $t_{½el}$: semivida de eliminación; Cl: aclaramiento; Vd: volumen de distribución en equilibrio; AUC: área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo; MRT: tiempo medio de residencia ; F: biodisponibilidad.

La administración de dosis múltiples de 25 y 50 mg/kg peso vivo de DEHP indujo un incremento de las concentraciones plasmáticas del compuesto, alcanzando valores estables en la tercera semana y manteniéndose, desde ese momento, en una concentración media de $0,29 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ (rango: $0,22-0,55 \mu\text{g/ml}$) para la dosis de 25 mg/kg y de $0,38 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ (rango: $0,25-0,49 \mu\text{g/ml}$) para la dosis de 50 mg/kg; las AUCs fueron 468 ± 8 y $588 \pm 15 \mu\text{g h/ml}$, respectivamente (Figura 3.2).

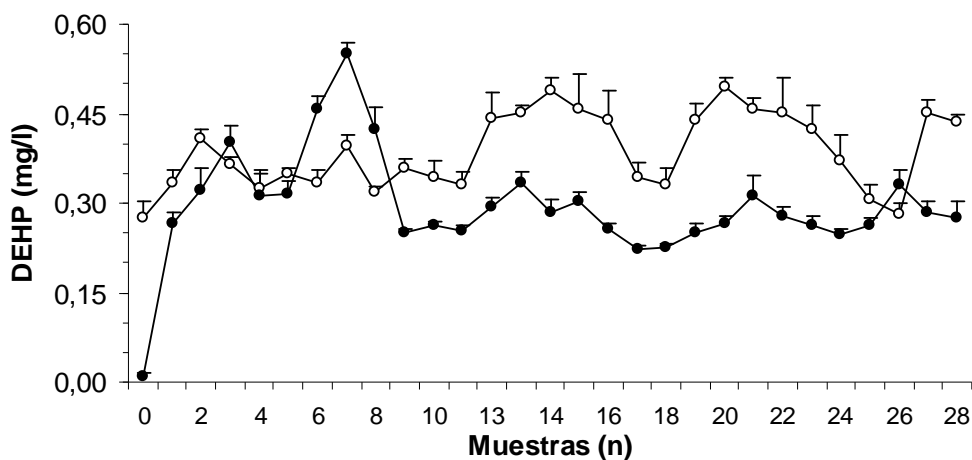


Figura 3.2. Concentraciones plasmáticas de DEHP (media \pm ESM) *versus* tiempo tras la administración por vía intramuscular de dosis múltiples (tres veces en semana) de 25 (puntos negros) y 50mg/kg (puntos blancos) de DEHP en ovejas.

Tabla 3.4. Parámetros farmacocinéticos (media \pm ESM) tras administración de dosis múltiples intravenosa e intramuscular (25 y 50 mg/kg) en oveja.

		DOSIS INTRAMUSCULAR MULTIPLE		
		25 mg/kg	50 mg/kg	
MPC _{BA}	rango	(μ g/ml)	0,22 - 0,55	0,25 - 0,82
	media		0,29 \pm 0,01	0,38 \pm 0,01
AUC		(μ g h/ml)	468,2 \pm 8,4	588,6 \pm 14,6
AUC/DOSIS		(kg h/l)	18,7	11,8

MPC_{BA}: concentración mínima plasmática antes de cada administración de DEHP. AUC: área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo

Discusión

Los resultados de este estudio indican que la administración de DEHP en ovejas, por vía intravenosa o intramuscular, se caracteriza por un lento proceso de disposición, con presencia de picos plasmáticos secundarios en diferentes momentos, un alto volumen de distribución y una vida media de eliminación prolongada; estas características se ven, además, afectadas por una alta variabilidad

individual. Sin embargo, la administración seriada, tres veces a la semana, de dosis intramusculares de DEHP, es eficaz para mantener concentraciones estables en valores superiores a los presentados por los individuos expuestos de forma natural al compuesto. Por ello, este régimen de administración puede, así, usarse para establecer un modelo adecuado que permita el estudio de los efectos de DEHP sobre la función reproductiva femenina.

Los estudios cinéticos de DEHP tras administraciones intravenosas o intramusculares en modelos animales son escasos; la mayoría de los trabajos publicados se han realizado por vía oral, ya que es considerada la vía de exposición no experimental más frecuente. En la presente memoria de Tesis Doctoral se eligió el uso de la vía intramuscular por dos razones principales; en primer lugar, este estudio no se diseñó específicamente para investigar la toxicocinética del DEHP en la oveja por sí misma, sino para establecer un modelo animal de toxicología reproductiva en hembras monotocas, basándonos en la utilidad de esta especie animal para tal fin, manifestada previamente por otros autores (Magnusson 2005; Campbell y col., 2007). En segundo lugar, la vía oral no sería la más apropiada para este propósito, ya que dificultaría la obtención de concentraciones plasmáticas de DEHP continuas y predecibles; la oveja, al ser un rumiante, presenta un acentuado metabolismo ruminal y diferentes características de absorción y digestión que animales monogástricos, que han demostrado influir sobre la cinética de diferentes xenobióticos administrados oralmente (Bogan y col., 1984). Así, la peculiaridad de la digestión ruminal magnificaría las diferencias previamente descritas entre especies monogástricas en cuanto a patrones de absorción oral, metabolismo presistémico y excreción de DEHP y sus metabolitos (Rhodes y col., 1986); en las especies monogástricas, el metabolito MEHP se forma en el intestino tras la administración oral de DEHP y presenta una absorción mayor que el ftalato original; con diferencias entre especies. En cerdos, los niveles plasmáticos de DEHP tras su administración oral permanecen cerca de la concentración basal, con un valor muy pequeño en la fracción de AUCs de DEHP:MEHP, y una discutible relación entre la administración oral del compuesto y las concentraciones sistémicas; en ratas, la

metabolización a MEHP es rápida y las concentraciones plasmáticas de MEHP son aproximadamente dos veces mayores que los niveles de DEHP (Kessler y col., 2001; Ljungvall y col., 2004; Koo y Lee, 2007).

En el presente estudio, los datos referentes a las relaciones entre concentración y tiempo tras la administración de dosis únicas de DEHP por vías intravenosa e intramuscular mostraron una significativa variabilidad individual, de forma similar a lo descrito en otras especies y vías de administración. El proceso de disposición era lento, con presencia de picos plasmáticos secundarios en diferentes tiempos, un elevado volumen de distribución y una vida media de eliminación muy larga. Los valores obtenidos en los datos de concentración plasmática y aclaramiento y volumen de distribución son similares a los previamente descritos para ratas, pero la semivida de eliminación y el MRT en nuestro estudio fueron de dos a cuatro veces mayores que tras la administración oral de similares dosis únicas en esa especie (Koo y Lee, 2007).

La duración y amplitud de los procesos de distribución y eliminación encontrados en el presente estudio sugieren que el DEHP podría ser retenido y acumulado en los tejidos y redistribuido después a lo largo de la fase de eliminación. La acumulación de DEHP en los tejidos de la oveja tras exposiciones orales experimentales ha sido descrita por Rhind y col. (2005); este proceso se produce principalmente en el tejido graso, aunque también se ha referido una acumulación significativa en músculo e hígado. Distribuciones similares, en diferentes tejidos, han sido definidas en ratas (Rhodes y col., 1986; Keys y col. 1999 refiriendo coeficientes de partición tejido: sangre de 21,8 en hígado, 351,0 en grasa, 6,5 en testículos y 6,1 en músculo;), cerdos (Jarosová y col., 1999; Ljungvall y col., 2004) y monos tití (Rhodes y col., 1983 y 1986; Kessler y col., 2004). La depleción de estos depósitos tisulares de DEHP podría generar los picos plasmáticos secundarios característicos y prolongar la vida media de eliminación plasmática del DEHP, de forma diferente para cada especie animal (Oishi y Hiraga, 1982; Ljungvall y col., 2004). Así, se han encontrado concentraciones de DEHP muy altas en tejido graso de cerdos,

transcurridos 30 días desde la administración oral del compuesto; mientras que, seis días después de la exposición oral a DEHP, solamente pequeñas cantidades del ftalato (2%) permanecían en los tejidos periféricos de ratas. Sobre la base de estos resultados, la vida media de eliminación y el MRT en el cerdo parecen similares a los resultados aquí obtenidos en la oveja, y ambos mayores que los publicados para ratas. La acumulación de DEHP en los órganos reproductivos ha sido descrita en ratas (vida media de 8 y 156 horas para tejido testicular y grasa epididimaria, respectivamente); este dato debe ser especialmente considerado ya que el mecanismo de acción tóxica de los ftalatos parece estar relacionado con la función gonadal (Riecke y Stahlmann, 2000).

El aclaramiento estimado para el DEHP en plasma en el actual estudio excede en gran medida la tasa de filtración glomerular previamente descrita para la oveja (1,8 ml/min/kg; Nesje y col., 1997). Este hallazgo sugiere la participación de mecanismos de secreción tubular y/o de eliminación extrarrenal (excreción o metabolismo, intestinal o biliar). Como ya se ha comentado, las vías metabólicas sistémicas y pre-sistémicas del DEHP parecen ser muy complejas y la concentración relativa e importancia de los metabolitos ha demostrado ser muy diferente para las distintas especies y rutas de administración (Albro y col., 1982). El metabolito monoéster (MEHP) se ha considerado el más importante y ha sido el más ampliamente estudiado tras la administración oral; sin embargo, recientemente, se ha descrito que al menos el 74% del DEHP administrado vía oral al hombre es transformado en metabolitos oxidados y excretado por vía urinaria, siguiendo un modelo de eliminación multifásico. Así, en una segunda fase de eliminación, algunos metabolitos oxidados (2cx-MMHP) son predominantes sobre otros compuestos y muestran una vida media de alrededor de 24 horas (Koch y col., 2004; Wittassek y Angerer, 2008; Högberg y col., 2008). La duración de la excreción en este modelo multifásico concuerda con el presente estudio.

Por otro lado, la biodisponibilidad calculada para el DEHP después de la administración intramuscular en nuestro estudio resultó ser mayor que aquellas estimadas tras administración oral en cualquier otra especie. Además, el ftalato fue

absorbido más rápidamente por vía intramuscular en las ovejas del presente experimento que en animales monogástricos (t_{max} = 1 y 2 horas en ratas y monos tití, respectivamente; Kessler y col., 2004), aunque las concentraciones máximas plasmáticas no eran diferentes a las obtenidas tras administración oral de dosis equivalentes (Rhodes y col., 1986; Koo y Lee, 2007). Además, debe destacarse que, en el presente estudio, no fueron observadas reacciones adversas en el sitio de administración, susceptibles de alterar la absorción del compuesto y limitar la aplicabilidad del régimen posológico del presente trabajo.

Finalmente, hay que comentar que los resultados obtenidos con los regímenes de dosis múltiples coinciden con estudios previos en cerdos, donde el DEHP mostró una larga vida media en tejidos y plasma; resultando en acumulación tisular durante varias semanas, aunque alcanzando niveles plasmáticos estables en un corto periodo de tiempo (Jarosová y col., 1999). Por otro lado, en nuestro estudio, las AUCs normalizadas del DEHP no variaban; lo que induce a pensar que la cinética del compuesto es lineal, al menos en el rango de las dos dosis investigadas. Usando dosis mayores, como habitualmente se realiza en tests de toxicidad, se podría esperar una pérdida de esta linealidad.

En los estudios de toxicidad reproductiva de fármacos y otros xenobióticos, las dosis administradas son frecuentemente mucho mayores que las dosis a las cuales el hombre se encuentra expuesto. Además, puesto que los procedimientos experimentales son realizados en otras especies animales distintas a la humana, una adecuada interpretación de los datos hace necesario considerar las posibles diferencias en toxicocinética relacionadas con la especie. Esta extrapolación, añadida a la comparación de dosis suele conllevar una sobreestimación del margen de seguridad (Riecke y Stahlmann, 2000). El DEHP es un ejemplo clásico de xenobiótico al cual los humanos se ven continuamente expuestos a bajas concentraciones; la ingesta media diaria para el DEHP en humano adulto ha sido estimada, según los autores, en 2,4-10,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, cantidades inferiores a los valores de los límites preventivos reconocidos internacionalmente (TDI = 20-48 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ y

RfD = 20 µg/kg/d; Clark y col., 2003a; Koch y col., 2003b; Wittassek y col., 2007). Sin embargo, algunos autores (Albro y Corbett, 1978; Koch y col., 2006) han estimado que estos valores preventivos pueden ser excedidos de forma individual, en ciertas poblaciones con riesgo a una exposición alta de DEHP (como donantes de plaquetas, que alcanzan 38 µg/kg/aféresis, o neonatos bajo cuidados médicos intensivos, con valores medios de 42 µg/kg/d y percentil 95% de 1780 µg/kg/d). Estos datos son especialmente importantes si consideramos que los recién nacidos se encuentran en uno de los momentos de la vida identificados como “ventana crítica” para los efectos tóxicos de los EDCs y que los cuidados médicos suelen realizarse utilizando vías de administración directas, sin limitaciones de la absorción o del metabolismo de primer paso (Riecke y Stahlmann, 2000; Crain y col., 2008).

Por todo ello, una comparación de la “exposición real” sobre la base de las concentraciones en plasma o en tejidos diana es mucho más razonable que una comparación de dosis, en ausencia de información sobre el comportamiento cinético del compuesto en el hombre y en el animal (Riecke y Stahlmann, 2000). De este modo, la relación AUC/MTC (área bajo la curva de concentración vs tiempo/concentración mínima tóxica) es un factor importante para la determinación de la actividad toxicológica en agentes dependientes de la concentración. Los regímenes de dosis múltiples del presente estudio superaron la ingesta estimada en exposiciones humanas y resultaron en niveles plasmáticos mantenidos por encima de la MTC estimada tanto *in vivo* como *in vitro* para efectos reproductivos (0,02 µg/ml; Laskey y Berman, 1993; Lovekamp y Davis, 2001), con un valor de la proporción AUC/MTC mayor a 125; lo cual era uno de los objetivos.

En conclusión, la administración de dosis múltiples de DEHP por vía intramuscular en la oveja puede ser utilizada en el desarrollo de un modelo experimental fiable para el estudio de la toxicidad reproductiva.

3.3. OBJETIVO 3. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE DEHP SOBRE LA CICLICIDAD REPRODUCTIVA, LA DINÁMICA DE CRECIMIENTO DEL CUERPO LÚTEO Y LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA.

Animales y toma de datos

Este estudio se realizó sobre un total de 22 ovejas adultas, entre 4 y 7 años. Los animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos; seis hembras fueron usadas como controles no tratadas (grupo CTL) y 16 ovejas fueron expuestas a DEHP mediante la administración de dosis intramusculares múltiples del compuesto, tres veces a la semana durante dos meses. Sobre la base de los resultados obtenidos en el experimento anterior, la mitad de estas 16 hembras fueron tratadas con dosis de 25 mg/kg de peso vivo (grupo DEHP25) y los restantes animales fueron tratados con el doble de la dosis (50 mg/kg peso vivo; grupo DEHP50). Los posibles efectos del DEHP fueron estimados mediante valoraciones morfométricas y funcionales seriadas (tres veces a la semana durante dos meses; equivalentes a 3-4 ciclos sexuales, ya que la duración media del ciclo en la oveja es alrededor de 17 días), de la actividad ovulatoria cíclica y del patrón de crecimiento y la actividad de los cuerpos lúteos.

La evaluación morfométrica de la ovulación y la dinámica de crecimiento y regresión del cuerpo lúteo fue realizada mediante ultrasonografía transrectal, como se describe en el Anexo I. La funcionalidad luteal fue evaluada mediante la determinación de la concentración plasmática de progesterona en las muestras de sangre obtenidas coincidiendo con la realización de las ecografías.

Análisis de los datos

Los efectos del tratamiento sobre los distintos parámetros evaluados se analizaron mediante comparación de los datos obtenidos en los dos grupos experimentales y en el grupo control. Así, los efectos sobre la longitud de los ciclos y sobre el número

y características de los cuerpos lúteos (área de tejido luteal y concentración de progesterona en plasma) en cada ciclo y durante todo el periodo de estudio, fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) para muestras repetidas o mediante análisis no paramétrico de comparación de medias muestrales (Test de Kruskal-Wallis), en caso de que un test de Levene previo mostrase que eran variaciones no homogéneas. Las comparaciones entre tasas o porcentajes se realizaron tras su transformación al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje. Para la evaluación de las variaciones en la longitud de los ciclos ováricos, éstos se clasificaron en tres clases: muy cortos (menores a 10 días), cortos (10 a 14 días) y normales (15 a 19 días). Todos los resultados se han expresado como la media \pm ESM o como tasa o porcentaje, tomándose $P < 0,05$ como significación estadística.

Resultados

La observación ultrasonográfica y la valoración de los niveles plasmáticos de progesterona durante el periodo de estudio muestran que tanto las ovejas control como las tratadas con DEHP presentaban actividad cíclica ovulatoria durante el periodo de estudio, sin diferencias significativas entre grupos en el número de cuerpos lúteos por ciclo. Sin embargo, la administración de DEHP presentó un efecto de tipo dosis-dependiente sobre la actividad ovárica, observándose diferencias significativas en la duración de los ciclos ováricos (Figura 3.3) y en la dinámica de crecimiento y regresión de los cuerpos lúteos (Tabla 3.5).

En este sentido, las hembras control mostraron ciclos regulares con una duración media de $17,1 \pm 0,5$ días (el 94,9% de los ciclos eran de 15-19 días de duración y solamente el 5,1% de los ciclos eran de corta duración, 10-14 días). En las ovejas tratadas con dosis de 25 mg/kg peso vivo de DEHP (grupo DEHP25), los ciclos observados durante el periodo de estudio tenían una duración media más corta ($15,1 \pm 0,9$ días, $P < 0,05$). En estos individuos, el 24,4% de los ciclos eran cortos y el 22,2% eran muy cortos (menores a 10 días); solamente el 51,1% eran de duración regular ($P < 0,05$ en comparación con el grupo control).

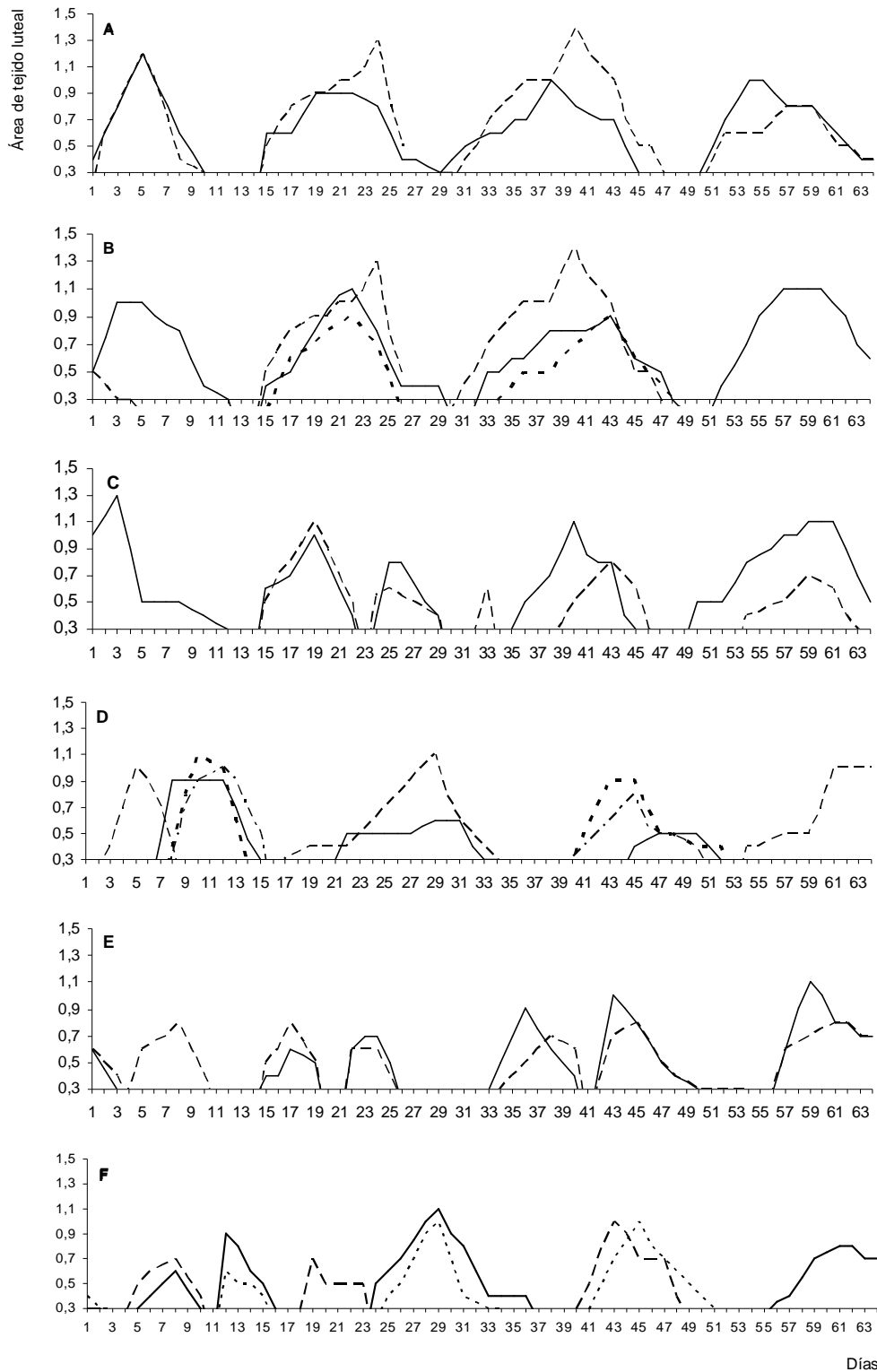


Figura 3.3. Perfiles de crecimiento y regresión de los cuerpos lúteos en ovejas control (CTL; A y B) y en ovejas tratadas con 3 dosis semanales de DEHP por vía intramuscular, de 25 mg/kg (grupo DEHP25; C y D) y 50 mg/kg de peso vivo (grupo DEHP50; E y F). Cada gráfica representa el área de los cuerpos lúteos (cm²) frente al tiempo (días) en un individuo; cada trazo corresponde a un cuerpo lúteo.

Tabla 3.5. Características principales de la actividad cíclica ovulatoria en ovejas control (CTR) y en ovejas tratadas con 3 dosis semanales de DEHP por vía intramuscular, de 25 mg/kg (grupo DEHP25) y 50 mg/kg peso vivo (grupo DEHP50).

	CTL	DEHP25	DEHP50
Número medio de ciclos	3,6±0,2 ^{c,e}	4,5±0,2 ^d	5,9±0,1 ^{c,f}
Longitud media del ciclo (días)	17,1±0,5 ^{a,e}	15,1±0,9 ^b	12,0±0,8 ^{a,f}
Número de ciclos regulares (%)	3,7±0,3 (94,9)	2,3±0,3 (51,1)	1,5±0,2 (25,4)
Número de ciclos cortos (%)	0,2±0,1 (5,1)	1,1±0,1 (24,4)	1,6±0,1 (27,1)
Número de ciclos muy cortos (%)	0	1,0±0,1 (22,2)	2,5±0,2 (42,3)
Número de CLs/ciclo	1,5±0,1	1,8±0,1	1,6±0,1
Características morfométricas del CL			
Área Máxima (cm ²)	1,1±0,2 ^e	0,9±0,1 ^{a,f}	0,8±0,1 ^{b,f}
Tasa de crecimiento (cm ² /día)	0,22±0,0 ^a	0,15±0,0 ^b	0,17±0,0 ^b
Fase de crecimiento (días)	7,9±0,5 ^c	6,9±0,4	5,9±0,4 ^d
Tasa de regresión (cm ² /día)	0,12±0,0 ^a	0,16±0,0 ^b	0,19±0,0 ^b
Fase de regresión (días)	8,4±0,4 ^e	6,5±0,3 ^{a,f}	5,5±0,4 ^{b,f}
Características funcionales del CL			
Concentración máxima de progesterona (ng/ml)	7,1±0,6 ^a	12,0±0,9 ^b	12,3±0,9 ^b

a≠b: P<0,05; c≠d: P<0,01; e≠f: P<0,005

En las ovejas tratadas con 50 mg/kg de peso vivo (grupo DEHP50), la duración media de los ciclos fue de $12,0 \pm 0,8$ días; un 25,4% de ellos eran de duración normal, mientras que el 27,1 y el 42,3% eran cortos y muy cortos, respectivamente. Todos estos parámetros mostraron diferencias significativas cuando fueron comparados con los grupos control y DEHP25 (Tabla 3.5).

Estas diferencias en la duración del ciclo estaban relacionadas con diferencias en las características de la dinámica de crecimiento y regresión del cuerpo lúteo, como también se detalla en la Tabla 3.5. En resumen, los grupos DEHP mostraron una velocidad de crecimiento más lenta y una velocidad de regresión más rápida, coincidente con fases más cortas de crecimiento y regresión.

El tamaño del tejido luteal estaba también afectado por un efecto dependiente de la dosis; así, los cuerpos lúteos eran de menor tamaño en el grupo DEHP50 que en el DEHP25 ($P < 0,05$) y en ambos grupos respecto al grupo control ($P < 0,005$). Sin embargo, las concentraciones máximas de progesterona plasmática en las ovejas control eran significativamente menores ($P < 0,05$) que en los grupos DEHP, cuyos individuos presentaban cuerpos lúteos supuestamente deficientes (Tabla 3.5). Aunque algunos de los ciclos más cortos de los grupos DEHP tenían una baja secreción de progesterona, los niveles plasmáticos de la hormona estaban elevados, en la mayoría de los ciclos observados, en las ovejas tratadas. Aún más, dos animales en cada uno de los grupos DEHP presentaron niveles de progesterona plasmática superiores a 20 ng/ml en todos sus ciclos, alcanzando uno de ellos (DEHP50) el valor de 52 ng/ml.

Discusión

Los resultados de este estudio, el primero que aborda los efectos de la exposición a DEHP sobre la actividad cíclica ovulatoria en hembras adultas de mamíferos superiores, indican claramente que dicha exposición altera la ciclicidad ovárica a corto plazo y de manera dosis-dependiente. El principal efecto observado es la

aparición de cuerpos lúteos de menor tamaño y vida más corta, lo que conlleva la aparición de ciclos cortos. Las características morfológicas de estos cuerpos lúteos parecen incompatibles con una adecuada función luteal; sin embargo, los niveles medios de progesterona en plasma eran mayores en las ovejas expuestas a DEHP, con un presunto cuerpo lúteo deficiente, que en las hembras control.

La evaluación morfológica de la dinámica de crecimiento y regresión del tejido luteal en las ovejas control mostró ciclos regulares de duración equivalente a la establecida previamente para la especie ovina y cuerpos lúteos similares a los descritas anteriormente para la raza Manchega (Letelier y col., 2009). Por el contrario, el seguimiento de las ovejas tratadas con DEHP mostró una menor velocidad de crecimiento del tejido luteal, con lo que se alcanzaba un tamaño máximo del cuerpo lúteo más pequeño; como, además, la velocidad de regresión fue mayor que en las ovejas control, el resultado final fue la aparición de fases luteales cortas y, por consiguiente, de ciclos ováricos cortos. La administración del ftalato también influyó sobre la duración de las fases de crecimiento y regresión y, con ello, sobre el porcentaje de ciclos irregulares en longitud; éstos fueron aproximadamente el 50% en ovejas tratadas con 25 mg/kg y alrededor del 75% en ovejas tratadas con 50 mg/kg de DEHP.

Estudios previos indican que las alteraciones en la funcionalidad luteal podían dividirse en dos clases principales, en función de la duración del cuerpo lúteo y de las características de la secreción de progesterona (Garverick y col., 1986; Hunter, 1991); así, se diferencian dos patrones de alteración de los cuerpos lúteos: los que cursan con duración normal pero con baja secreción de progesterona y otros con corta duración pero con secreción normal de progesterona. En nuestro estudio, los cuerpos lúteos son de corta duración; sin embargo, los niveles plasmáticos de progesterona son mucho mayores que los valores normales esperables en una oveja, y excepcionalmente altos en algunos de los individuos; un hallazgo opuesto a lo esperado cuando observamos las características morfológicas de los cuerpos lúteos.

La evaluación ultrasonográfica del área luteal es un método fiable para la estimación de los niveles plasmáticos de progesterona en ovejas durante todo el ciclo (Gonzalez-Bulnes y col., 2000); así, era esperable que los cuerpos lúteos pequeños e irregulares de las ovejas expuestas a DEHP dieran lugar a insuficiencia luteal y muy bajos niveles de progesterona en plasma. Por otro lado, los datos de este estudio estarían en contradicción con los trabajos recientemente publicados que muestran una disminución de la secreción de progesterona por células de la granulosa luteinizadas y mantenidas en cultivo *in vitro*, en presencia de DEHP, procedentes de ratas (Svechnikova y col., 2007) y de cerdos (Mlynarčíková y col., 2009).

Este hecho podría relacionarse con un posible artefacto experimental. En realidad, en este experimento no se ha valorado la secreción de progesterona por los cuerpos lúteos, sino las concentraciones plasmáticas de progesterona; y éstas podrían resultar elevadas no por un incremento de su secreción sino por una disminución de su metabolismo. Algunos estudios indican que los niveles plasmáticos de progesterona dependen en mayor medida del aclaramiento metabólico que de los niveles de secreción del cuerpo lúteo (Parr y col., 1993), como se confirmó más tarde mediante el estudio de metabolitos de la progesterona exógena en heces de vacas ovariectomizadas (Rabiee y col., 2002). Esta posible alteración en el metabolismo de la progesterona que proponemos se relaciona con el hecho bien conocido de que, en los mamíferos, la progesterona es rápidamente metabolizada por el hígado (revisado por Rico, 1983), cuya funcionalidad posiblemente se encuentre afectada por efecto del DEHP. Previamente ya se demostró, en los primeros estudios sobre su toxicidad, que el DEHP actuaba como supresor de la actividad enzimática hepática (Hinton y col., 1986; Badr, 1992) y como proinflamatorio en el hígado de ratas (Grande y col., 2006). En la última fase de este estudio, valoramos la posible presencia de lesiones histológicas en el hígado de ovejas expuestas a DEHP; a diferencia de las ovejas control, las primeras mostraban presencia de infiltración inflamatoria, degeneración grasa y necrosis. Sin embargo, la confirmación de nuestra hipótesis requiere estudios complementarios.

En cualquier caso, los resultados encontrados en el presente experimento indican una mayor incidencia de ciclos cortos y muy cortos debido a la exposición a DEHP, lo cual es contradictorio con estudios realizados previamente en roedores adultos. Estos experimentos previos mostraron que la exposición a DEHP resultó en ciclos estrales prolongados (Davis y col., 1994; Hirosawa y col., 2006; Mao y col., 2006; Takai y col., 2009). Aunque a primera vista, los resultados de los dos trabajos parecen ser opuestos, existen dos factores que deben tenerse en cuenta antes de evaluar estas diferencias. Primero, la prolongación del ciclo descrita en los trabajos previos era causada por ausencia o retraso de la ovulación, como también se ha descrito en algunos estudios tras la administración exógena de gonadotropinas para inducir la ovulación (Sekiguchi y col., 2006). Segundo, las diferencias entre estudios pueden estar influidas por la especie, ruta, dosis, y periodo de administración del DEHP. Así, es posible hipotetizar que las alteraciones encontradas en estos trabajos previos y en nuestro estudio, aunque se manifiesten de diferente manera, pueden estar basadas en un mismo mecanismo de acción del ftalato, que afectaría a la funcionalidad de los mecanismos de regulación del eje hipófisis-ovario.

En primer lugar, tanto la aparición de fallos ovulatorios como una inadecuada función luteal han sido vinculadas a la alteración del desarrollo y de la maduración de los folículos preovulatorios (White y col., 1987; Keisler y Keisler, 1989). Concretamente en ovejas, deficiencias en la dinámica folicular conllevan deficiencias en la secreción de estradiol durante la fase preovulatoria; posteriormente, estas alteraciones se relacionan con deficiencias en la capacidad de los folículos para ovular y dar lugar a un cuerpo lúteo funcional (Gonzalez-Bulnes y col., 2005). Coincidentemente, Berman y Laskey (1993) señalaron que ratas tratadas con DEHP presentan una menor secreción de estradiol durante el proestro y Davis y colaboradores (1994) propusieron el inadecuado desarrollo de los folículos preovulatorios (menor tamaño folicular y menor secreción de estradiol) como la causa de las alteraciones ovulatorias descritas también en ratas expuestas a DEHP.

Posteriormente, se ha demostrado que la deficiente producción de estradiol en los folículos de ratas tratadas se relacionaba con la inhibición de actividad aromatasa en las células de la granulosa (Lovekamp y Davis, 2003).

Una segunda posible causa de alteraciones en la secreción de progesterona, además de deficiencias en los folículos preovulatorios, sería una baja secreción de LH, por parte de la pituitaria, durante la fase luteal temprana. La LH es el factor luteotrópico necesario para la luteinización y desarrollo del cuerpo lúteo y para la producción de progesterona (Milvae y col., 1996; McCracken y col., 1999). La influencia ejercida por la LH es crítica para el desarrollo y mantenimiento del cuerpo lúteo (Baird, 1992; Smith y col., 1994; Niswender y col., 2000) y para la capacidad estereidogénica a largo plazo de las células luteales (Rao, 2001; Niswender, 2002). Estudios preliminares de Davis y col. (1994), realizados *in vivo*, indican alteraciones en la descarga preovulatoria de LH por efecto de la exposición a DEHP. Sin embargo, un estudio reciente indica un incremento en la producción de LH en cultivos primarios de células de la pituitaria de ratas expuestas a DEHP (Svechnikova y col., 2007).

En conclusión, este tercer experimento indica que la exposición a DEHP produce efectos negativos, y dependientes de la dosis, sobre la ciclicidad ovárica y la función luteal; en concreto, se observaron ciclos cortos debidos a la presencia de cuerpos luteos de pequeño tamaño y vida corta. La determinación de las causas de estas deficiencias ovulatorias, ya sea por un efecto negativo a nivel ovárico (afectando la función folicular preovulatoria) o por un efecto negativo a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (afectando los mecanismos regulatorios de GnRH y LH sobre la función luteal), hace necesaria la realización de estudios complementarios; estudios que se abordaron en el cuarto experimento de la presente Memoria de Tesis Doctoral.

3.4. OBJETIVO 4. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE DEHP SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA E HIPOFISARIA EN LA FASE FOLICULAR Y LUTEAL TEMPRANA DEL CICLO SEXUAL Y SU POSIBLE RELACIÓN CON ALTERACIONES HEPÁTICAS

Animales y toma de datos

Este estudio se realizó sobre un total de 14 ovejas Manchegas adultas, entre 4 y 7 años de edad. Dos meses antes del inicio del periodo experimental, los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos; seis hembras fueron usadas como controles no tratadas (grupo CTL) y 8 ovejas fueron expuestas a DEHP mediante la administración de dosis intramusculares de 50 mg/kg peso vivo de DEHP, tres veces a la semana durante dos meses.

El periodo experimental se llevó a cabo durante febrero, en la estación reproductiva descrita para esta raza en nuestra latitud. Después de dos meses de exposición a DEHP, el celo y la ovulación fueron sincronizados, en todos los animales, mediante el tratamiento, durante seis días, con esponjas intravaginales impregnadas con progestágenos (40 mg de acetato de fluorogestona [FGA], Chronogest[®]; Intervet International, Boxmeer, Holanda); asimismo, se administró una dosis intramuscular de 125 µg de cloprostenol (Estrumate[®], Mallinckrodt Vet GmbH, Friesoythe, Alemania) en el momento de inserción del progestágeno.

Los posibles efectos del DEHP fueron estimados durante la fase folicular y la fase luteal inducidas por el tratamiento hormonal. La aparición de sintomatología de celo fue determinada cada 12 horas, entre las 12 y las 60 horas tras la retirada del progestágeno, mediante machos adultos entrenados; el día de detección de celo se consideró Día 0 a efectos experimentales.

El desarrollo y la función folicular durante la fase folicular, desde la retirada del progestágeno a la aparición del celo, fueron valorados por ultrasonografía

transrectal y mediante la determinación de la concentración plasmática de estradiol en muestras de sangre obtenidas coincidiendo con la realización de las ecografías. La dinámica de crecimiento y la función de los cuerpos lúteos fueron valoradas durante el periodo de crecimiento rápido e intensa luteogénesis que ocurre entre los días 1 y 5 de la fase luteal, mediante ultrasonografía y determinación de las concentraciones plasmáticas de progesterona. En el Día 5 de la fase luteal, la función hipofisaria y, con ello, el soporte luteotrópico se evaluaron mediante determinación de la secreción pulsátil de LH; para ello, se realizaron muestreos intensivos de sangre, cada 15 minutos durante 4 horas. Inmediatamente, las hembras fueron sacrificadas mediante una sobredosis de T-61[®] (Intervet International, Boxmeer, Holanda) y se obtuvieron los ovarios (muestras de cuerpo lúteo) y muestras de hígado.

Análisis de los datos

Los efectos del tratamiento sobre el número y tamaño de los folículos y cuerpos lúteos y sobre las concentraciones hormonales fueron valorados mediante análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas, análisis no paramétrico de comparación de medias muestrales (test de Kruskal-Wallis) en caso de que un test de Levene previo mostrase que eran variaciones no homogéneas y análisis de rango múltiple de Duncan para la valoración de interacciones significativas. El estudio de la relación entre folículos de diferentes tamaños, área del cuerpo lúteo, concentraciones hormonales y día del ciclo fue realizado mediante análisis de regresión y correlación de Pearson. Los efectos del tratamiento con DEHP sobre la pulsatilidad de LH fueron evaluados por comparación de la frecuencia y amplitud de los pulsos por ANOVA de una sola vía. Todos los resultados eran expresados como la media \pm ESM o como tasa o porcentaje y la significación estadística era aceptada desde $P < 0,05$.

Resultados

Todas las ovejas mostraron comportamiento de celo y ovularon, en respuesta a la retirada del progestágeno, sin observarse diferencias en la tasa de ovulación entre el grupo control y tratado con DEHP ($1,6 \pm 0,2$ en CTL y $1,4 \pm 0,3$ en DEHP).

Dinámica del folículo preovulatorio y secreción de estradiol

El análisis retrospectivo de la dinámica folicular preovulatoria no mostró, en conjunto, diferencias entre grupos. Todos los folículos ovulatorios en el grupo DEHP y el 90% del grupo CTL surgieron de folículos presentes en el momento de la retirada del tratamiento progestativo y sus diámetros medios fueron similares entre grupos en el momento de la retirada del progestágeno ($3,5 \pm 0,4$ mm en CTL y $3,7 \pm 0,3$ mm en DEHP, Figura 3.4.A). Durante la fase folicular, estos folículos aumentaron su diámetro ($r = 0,736$; $P < 0,0001$), con una velocidad de crecimiento similar ($1,3 \pm 0,2$ mm/día en CTL y $1,3 \pm 0,3$ mm/día en DEHP), para alcanzar similares diámetros máximos finales ($6,1 \pm 0,3$ mm en CTL y $6,3 \pm 0,2$ en DEHP).

Asimismo, las concentraciones plasmáticas de estradiol aumentaron linealmente en ambos grupos desde la retirada de la esponja hasta el momento de aparición del celo (de $6,4 \pm 0,5$ pg/ml en el momento de retirada del progestágeno a $9,6 \pm 0,5$ pg/ml en el momento del celo, $P < 0,05$, en CTL y de $10,4 \pm 0,8$ a $20,4 \pm 1,6$ pg/ml, $P < 0,01$, en DEHP). Sin embargo, los niveles de estradiol fueron significativamente mayores en ovejas expuestas a DEHP ($P > 0,001$; Figura 3.4.B).

Estos cambios en el número, tamaño y función esteroidogénica de los folículos ovulatorios se relacionaron con un descenso significativo en el número de folículos pequeños (2-3 mm) y medianos (4-5 mm) en ambos grupos ($r = -0,618$, $P < 0,05$ para folículos pequeños y $r = -0,517$, $P < 0,05$ para folículos medianos); el número de folículos en cada categoría no era significativamente diferente entre grupos (Figura 3.4.C y D).

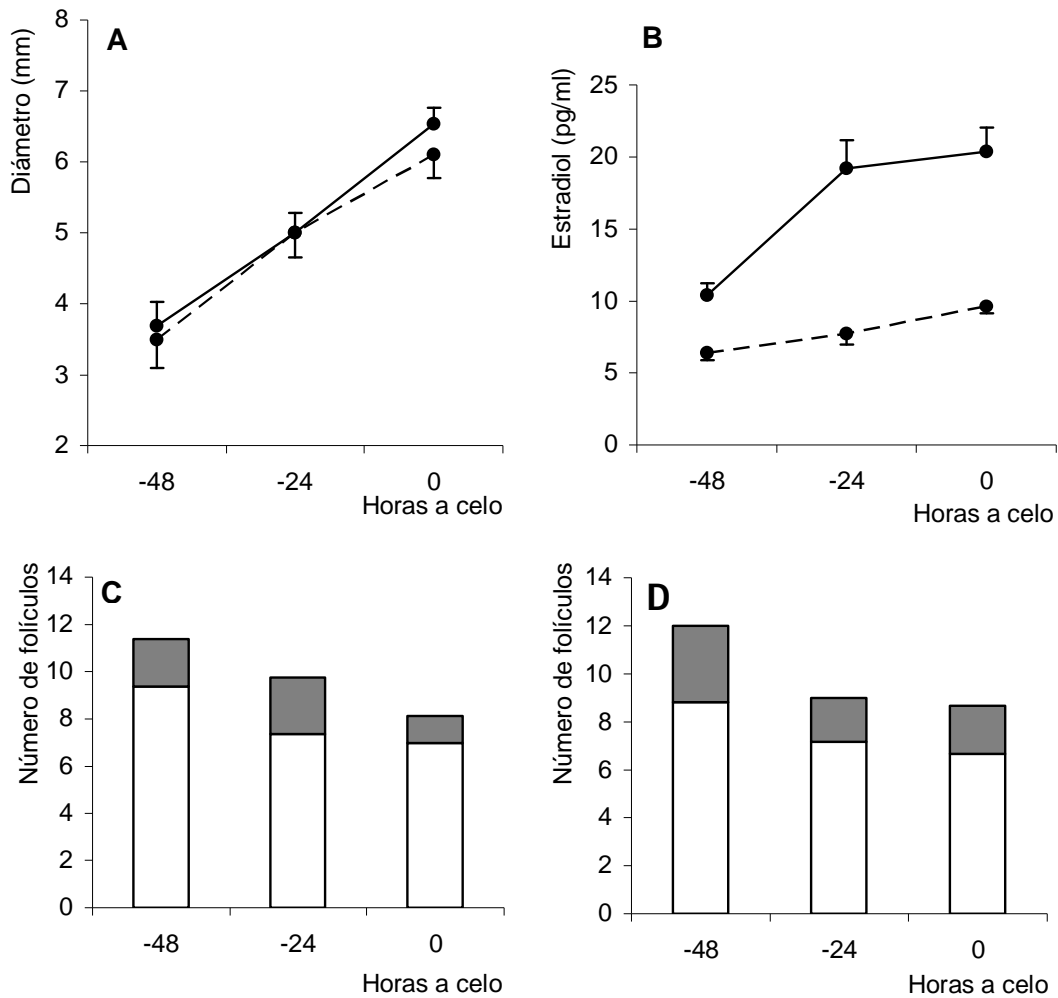


Figura 3.4. Diámetro medio (\pm SEM) de los folículos ovulatorios (A), niveles plasmáticos medios (\pm SEM) de estradiol (B) en ovejas CTL (trazo discontinuo) y ovejas del grupo DEHP (trazo continuo) y distribución de la población de folículos pequeños (2-3mm; barra blanca) y medianos (4-5mm; barra gris) en ovejas CTL (C) y DEHP (D) durante los dos días previos a la detección de los síntomas de celo.

Dinámica del crecimiento y secreción de progesterona del cuerpo lúteo

En todos los animales, la medida individual del área del cuerpo lúteo mostró un crecimiento lineal ($r= 0,725$, $P<0,0001$), desde el Día 1 ($0,4 \pm 0,1$ cm² en CTL y $0,3 \pm 0,1$ cm² en DEHP) al Día 5 ($0,6 \pm 0,1$ cm² en CTL y $0,5 \pm 0,3$ cm² en DEHP). Las tasas de crecimiento diario no eran significativamente diferentes entre grupos ($0,10$ cm²/día para CTL y $0,08$ cm²/día para DEHP); así, el tamaño del cuerpo lúteo en el Día 5, aunque ligeramente mayor en ovejas control (Figura 3.5.A), no era

significativamente diferente entre ambos grupos. No se encontraron diferencias en la tasa de ovulación media y la evolución de la cantidad total de tejido luteal en las ovejas con ovulación única o múltiple aumentó con el tiempo pero, de nuevo, sin diferencias significativas entre grupos (Figura 3.5.B).

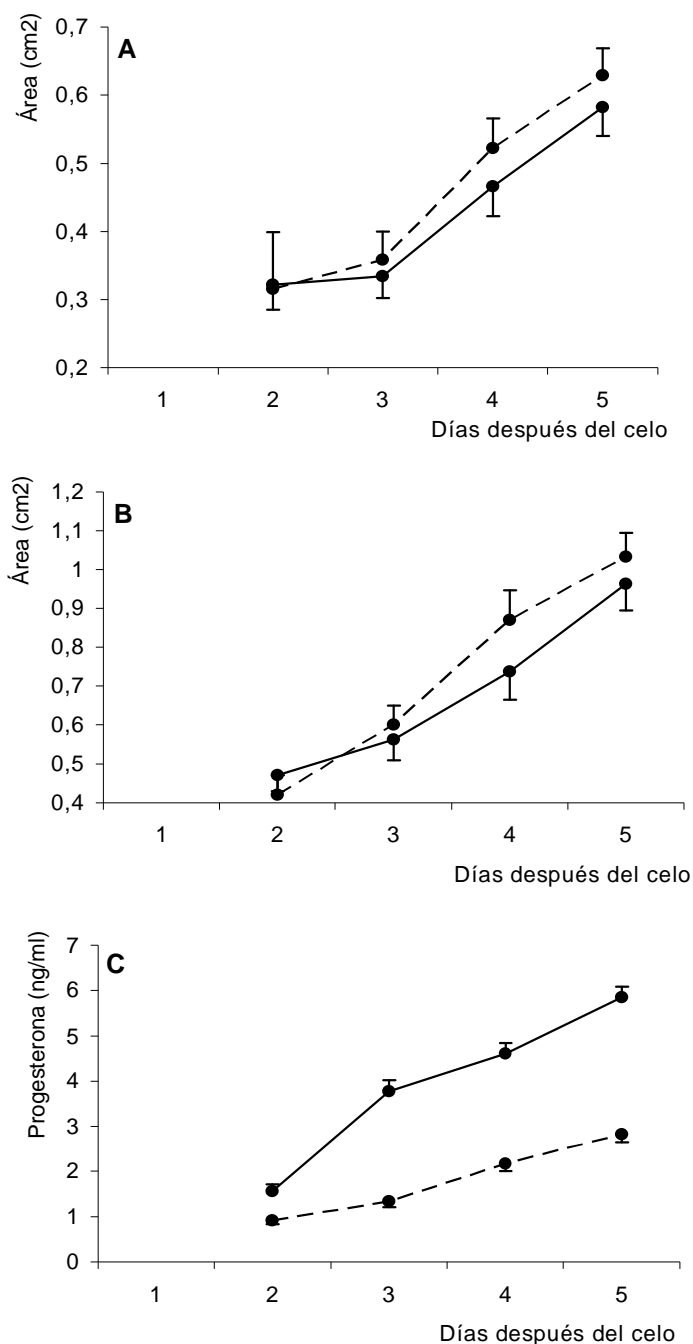


Figura 3.5. Tamaño medio (área \pm SEM) individual de los cuerpos lúteos (A) y total de tejido luteal (B), y concentración plasmática media (\pm SEM) de progesterona (C) en ovejas CTL (trazo discontinuo) y tratadas con DEHP (trazo continuo) durante los cinco días posteriores a la detección de los síntomas de celo.

La concentración plasmática de progesterona aumentó con el tiempo en ambos grupos ($r = 0,626$, $P < 0,05$ para CTL y $r = 0,755$, $P < 0,001$ para DEHP). El patrón de secreción de la progesterona con el tiempo era similar en el grupo control y en el tratado con DEHP, pero las concentraciones plasmáticas entre grupos eran muy diferentes (Figura 3.5.C); las ovejas expuestas a DEHP tenían valores significativamente mayores desde el Día 2 después del celo y en el Día 5 alcanzaron valores dos veces mayores que en el grupo control ($P < 0,05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la distribución celular de los CLs.

Secreción de LH

Las concentraciones medias basales de LH durante los periodos de muestreo de sangre para la determinación de la liberación pulsátil de LH fueron $0,7 \pm 0,1$ ng/ml en ovejas CTL y $0,3 \pm 0,1$ ng/ml en ovejas DEHP ($P < 0,05$). En el grupo CTL, la frecuencia de pulsos de LH fue de 0,3 pulsos/4h, con una amplitud de 0,6 ng/ml. Por el contrario, la secreción pulsátil de LH en el grupo con DEHP fue indetectable durante el periodo de muestreo.

Caracterización histológica de las muestras hepáticas

En el análisis de las muestras hepáticas de los animales del grupo DEHP se aprecia la presencia de extensas áreas de infiltrado inflamatorio (principalmente linfocitos) en el espacio porta; especialmente importante en tres hembras, identificadas con los números 2, 7 y 8. La oveja 2 tenía, además, áreas de degeneración grasa pericentrolobulillar y la oveja 7 presentaba, además, focos de necrosis de hepatocitos y presencia de células inflamatorias en el parénquima hepático. En el momento del sacrificio, sus concentraciones plasmáticas de progesterona alcanzaron valores de 11,7 y 6,4 ng/ml respectivamente; el valor medio en las ovejas control fue 2,8 ng/ml.

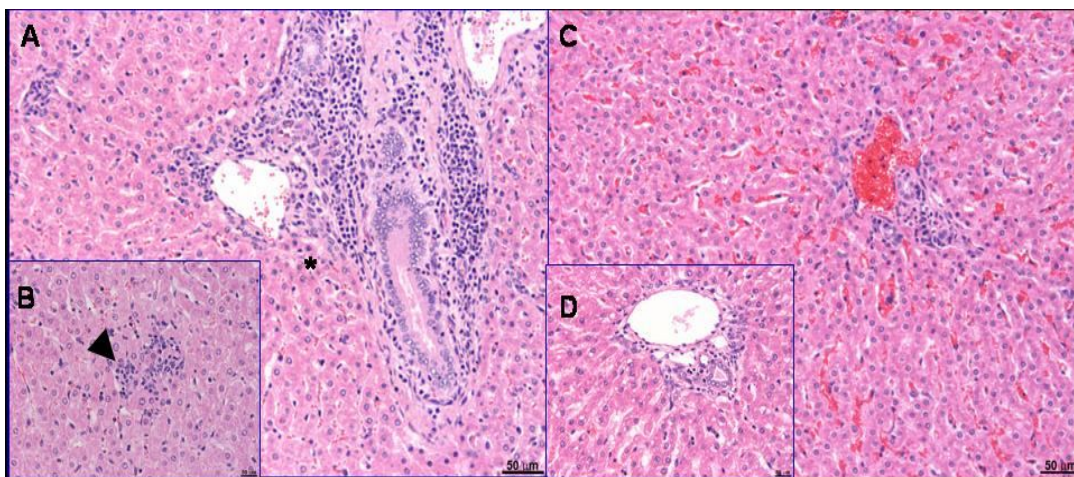


Figura 3.6. Imagen del tejido hepático en una oveja del grupo DEHP (A: 10x), donde se observa el espacio porta con células inflamatorias (marcado con asterisco) y, un foco necrótico-inflamatorio, marcado con la punta de flecha, en el parénquima (B: 20x). A la derecha, imagen del tejido hepático (C: 10x; D: 20x) en una oveja control en que se ve el espacio porta sin lesiones

Discusión

El punto de partida para el presente estudio fue el hallazgo, en el desarrollo del tercer objetivo experimental, de un efecto adverso de la exposición a DEHP sobre la función ovárica. Concretamente, se encontraron cuerpos lúteos de pequeño tamaño y corta duración; lo cual tenía como consecuencia la aparición de ciclos de corta duración. El objetivo de este cuarto experimento contemplaba el estudio de la dinámica de crecimiento y la función estereoidogénica de los folículos ováricos y de los cuerpos lúteos y del patrón de secreción de LH durante la fase folicular y la fase luteal temprana para establecer sus respectivos papeles en los efectos encontrados previamente. Los resultados indican que la administración de DEHP no afecta al desarrollo de los folículos preovulatorios ni de los cuerpos lúteos y sí a la secreción de LH; lo cual sugiere más una disfunción de los mecanismos de retroalimentación entre hipotálamo e hipófisis que una influencia directa sobre el ovario.

La evaluación ultrasonográfica de la dinámica de crecimiento del folículo preovulatorio, tanto en lo que se refiere a la evolución del diámetro como a los cambios en el número y tamaño de los folículos subordinados, no mostró

diferencias entre los grupos experimentales ni entre éstos y los datos previamente descritos en la oveja en general y en la raza Manchega en particular (Gonzalez-Bulnes y col., 2005; Gonzalez-Añoover y col., 2007; Letelier y col., 2009). La misma situación se produjo en la valoración morfológica del cuerpo lúteo; en el actual estudio, centrado en el periodo de intensa luteogénesis que se produce durante la fase luteal temprana, no se encontraron efectos significativos de la exposición a DEHP sobre el patrón de crecimiento del tejido luteal, que fue también similar a lo descrito previamente en ovejas de raza Manchega (Gonzalez-Bulnes y col., 2005; Gonzalez-Añoover y col., 2007; Letelier y col., 2009). Esta ausencia de diferencias entre animales control y tratados es también coincidente con los resultados del objetivo anterior.

En el experimento anterior, la fase de crecimiento de los cuerpos lúteos en las ovejas tratadas con DEHP era alrededor de 5-6 días, y después iniciaban la regresión, establecimos el Día 5 del ciclo como el día crítico para la evaluación histológica del cuerpo lúteo en el presente experimento. En el estudio histológico, coincidiendo con la ultrasonografía, no se encontraron alteraciones en el tejido luteal que diferenciaban las ovejas control de las expuestas a DEHP.

La evaluación de la secreción hormonal de los folículos preovulatorios y los cuerpos lúteos mostró, por el contrario, un claro efecto de la exposición al DEHP; las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona en ovejas tratadas con DEHP eran significativamente mayores que en ovejas control e, incluso, alcanzando valores excepcionalmente altos en algunas de las hembras. Este hallazgo confirma los resultados encontrados en el tercer experimento de esta Memoria, en el que los cuerpos lúteos pequeños e irregulares de ovejas expuestas a DEHP coincidían con niveles plasmáticos de progesterona muy altos. Finalmente, en vista de los hallazgos de este estudio y del previo, realizamos la biopsia y evaluación histológica de los hígados de las ovejas expuestas a DEHP y encontramos grandes áreas de infiltración inflamatoria, degeneración grasa y necrosis; lesiones que son indicio de disfunción hepática. Estas lesiones eran compatibles con un cuadro de hepatitis reactiva con

degeneración hidrópica de las células e incluso, en algún animal, degeneración grasa y necrosis. La hepatitis reactiva se produce en respuesta a una enfermedad sistémica, la degeneración hidrópica representa un estado de lesión celular en la que se produce alteración de las membranas de las organelas citoplasmáticas y rotura de las mismas. Entre esas organelas alteradas estarían las mitocondrias y los lisosomas; que, por otro lado, juegan un papel importante en los procesos de metabolización en el hígado.

Estos hallazgos son similares a los descritos previamente en trabajos con diferentes especies animales expuestas a DEHP, que reseñan inflamación y congestión hepática, acompañada de vacuolización y degeneración grasa (Carpenter y col., 1953; Omori, 1976); en primates, se ha descrito necrosis e infiltración de células inflamatorias (Jacobson y col., 1977). Asimismo, se ha observado aumento del tamaño de los hepatocitos y alteraciones en lisosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico liso de hurones (Lake y col., 1976).

En una amplia revisión de Seth (1982) sobre los efectos hepáticos de los ftalatos, este autor señala que lisosomas y mitocondrias parecen ser las dianas de la intoxicación por DEHP; ello causa daños hepáticos funcionales, reflejados por cambios morfológicos, alteraciones en la actividad de algunas enzimas hepáticas y en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

En cualquier caso, el resultado más importante del presente estudio es el hecho de que las ovejas expuestas al DEHP tenían las concentraciones basales de LH disminuídas y la frecuencia de los pulsos de LH alterados en comparación con las ovejas control. Las alteraciones en la secreción de la LH podrían causar alteraciones en el desarrollo y funcionalidad del cuerpo lúteo; que es la situación encontrada en las hembras expuestas a DEHP. Sin embargo, es posible hipotetizar que la pulsatilidad de la LH no estaba completamente abolida. Si fuera así, se detectarían alteraciones en el desarrollo folicular y, posteriormente, en la ovulación. En las ovejas, como en otros mamíferos, la actividad del ciclo reproductivo depende de

cambios cíclicos en los niveles endógenos de gonadotropinas; un incremento de la secreción de FSH recluta una cohorte de folículos que entran en crecimiento terminal (McNeilly y col., 1991). Los folículos en crecimiento más grandes de la cohorte secretan inhibina y estradiol, que deprimen la secreción de FSH; estos folículos evitan su regresión en ausencia de FSH cambiando su dependencia de FSH hacia LH. Por lo tanto, la presencia de LH circulante se convierte en esencial para los folículos dominantes (Campbell y col., 1995; Adams, 1999). Además, la maduración final del folículo preovulatorio también es dependiente de la LH y, finalmente, el acontecimiento de la oleada de LH preovulatoria y la ovulación es el resultado del incremento previo en la pulsatilidad de la LH (Baird y McNeilly, 1991); ninguno de estos procesos se produciría sin LH circulante.

De este modo, la exposición a DEHP afecta la pulsatilidad de la LH, pero no es probable que la inhiba completamente; al menos, no en las dosis usadas en este trabajo. Estudios previos realizados en roedores y usando dosis mayores mostraron que exposiciones a DEHP causaban alteraciones en los niveles de LH preovulatorios (Davis y col., 1994) y daban lugar a ausencia o retraso de las ovulaciones (Davis y col., 1994; Hirosawa y col., 2006; Mao y col., 2006; Sekiguchi y col., 2006). Por lo tanto, en resumen, tanto los resultados previos de otros autores como los nuestros indican que los efectos del DEHP sobre la actividad reproductiva femenina son mediados por alteraciones en la secreción de LH; a pesar de las diferencias entre estudios, que pueden estar relacionadas con diferentes rutas, dosis y periodos de administración del compuesto.

Los resultados del presente estudio, en el cual la exposición a dosis bajas-medias de DEHP induce alteraciones de la pulsatilidad de LH, explicarían el descenso en la tasa de gestaciones y mayor incidencia de abortos, sin supresión de la ciclicidad, descrita en mujeres como efecto de la exposición a ftalatos (Aldyeva y col., 1975). Los fallos en la pulsatilidad de LH pueden no ser suficientemente importantes para evitar la ovulación y luteogénesis temprana, pero pueden comprometer el posterior desarrollo del cuerpo lúteo, como encontramos en el tercer experimento, y puede

conllevar alteraciones en la maduración del oocito que limiten su capacidad para el desarrollo. Se ha visto, usando la oveja como modelo, que la inhibición de la pulsatilidad endógena de LH por administración de antagonistas de la GnRH no afecta a la ovulación y desarrollo oocitario *in vitro*, pero se asocia con tasas menores de fertilización y desarrollo embrionario y una mayor tasa de degeneración embrionaria (Oussaid y col., 1999; Cogne y col., 2003). No obstante, la confirmación de esta hipótesis requiere de estudios complementarios.

Los resultados obtenidos pueden conducir a la realización de trabajos cuyo objetivo sea dilucidar los mecanismos causantes de las alteraciones encontradas en el patrón de secreción de LH. En principio, la secreción de LH estaría afectada por efectos a nivel del hipotálamo y/o la hipófisis. La GnRH secretada por el hipotálamo es la señal primaria para la secreción de FSH y LH desde la pituitaria. Alteraciones en la secreción de GnRH causarían alteraciones no sólo en la secreción de LH, sino también de FSH, lo cual implicaría alteraciones en el desarrollo folicular; tales efectos no se encontraron en el presente estudio. Sin embargo, un posible efecto del DEHP sobre el hipotálamo y secreción de la GnRH no puede ser totalmente descartado; debemos tener presentes las diferencias en la regulación de la FSH y LH por la GnRH. La síntesis y secreción de la LH es totalmente dependiente de GnRH; la situación es diferente para la FSH, capaz de almacenarse en vesículas intracelulares y producir una secreción residual tras el cese experimental de la estimulación de la GnRH (Padmanabhan y McNeilly, 2001). Sin embargo, las alteraciones en la hipófisis anterior afectarían la secreción de ambas gonadotropinas; la ausencia de diferencias en el crecimiento de folículos dependientes de la FSH en este estudio sugiere que los efectos inhibidores del DEHP sobre la secreción de LH no se deberían a una acción directa sobre la pituitaria, aunque se necesitarían estudios específicos para comprobar esta hipótesis.

Una posible alternativa que explicaría los efectos del DEHP sobre la secreción de la LH, independiente de la acción directa sobre el eje hipotálamo-hipofisario, se encontraría en los altos niveles séricos de progesterona encontrados en los

Objetivos 3 y 4 de esta Memoria. La progesterona es el factor clave para el establecimiento y mantenimiento de la gestación, pero también juega un papel crucial en el eje reproductivo. La progesterona ejerce una acción inhibitoria sobre la liberación de GnRH desde el hipotálamo, resultando en una estimulación inadecuada de la síntesis y liberación de LH por parte de la hipófisis; de este modo, la progesterona ejerce una acción supresora sobre la liberación de LH (Robinson y col., 2003). Por lo tanto, es posible plantear la hipótesis de que altos niveles de progesterona en ovejas expuestas a DEHP, probablemente debidos a una disfunción hepática, pueden estar modificando las relaciones entre GnRH y LH y afectando la función reproductiva.

En conclusión, el presente estudio indica que las alteraciones en la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo descritos previamente en hembras expuestas a DEHP estarían relacionados con una secreción inadecuada de LH. Al mismo tiempo, los datos actuales sugieren que esta disfunción secretora se relaciona probablemente con las altas concentraciones de progesterona circulantes, que interfieren el sistema de retroalimentación regulador del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

4. DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general en el desarrollo del trabajo experimental correspondiente a esta Tesis Doctoral, como se detalla en el apartado de Justificación y Objetivos, era la *determinación del efecto de la exposición a DEHP, durante cortos periodos de tiempo, sobre la actividad reproductiva femenina*, utilizando la oveja como modelo experimental.

En el apartado de Revisión Bibliográfica de esta memoria, se justifica, a nuestro entender, la pertinencia de este objetivo general. Clásicamente, la función reproductiva se considera determinada por factores endógenos, dependientes del animal, y factores exógenos, dependientes del medioambiente en que se desenvuelve el individuo. Entre estos últimos, se consideraban, como factores determinantes, el fotoperíodo, el termoperíodo, la nutrición y los factores sociales y de manejo.

En el sistema de vida en que se desenvuelve la sociedad actual, aparece un nuevo factor; los xenobióticos y, entre ellos, los contaminantes o, como anglicismo, polutantes. Los plásticos y, con ello, los plastificantes constituyen un elemento omnipresente en nuestro entorno diario; en la actividad industrial, los principales componentes plásticos son el bisfenol A y las diferentes clases de ftalatos.

El bisfenol A es utilizado, en una cantidad anual cercana a los 2 millones de toneladas, principalmente para la producción de policarbonatos y resinas epoxi. Entre sus principales usos, destacan la fabricación de equipamiento deportivo, CDs y DVDs, electrodomésticos, instrumental médico y dental, empastes dentales, lentes de contacto, botellas, biberones y el recubrimiento interno de latas de comida y bebida.

Los ftalatos son utilizados, en una cantidad anual aproximada de 400.000 toneladas, en la fabricación de plásticos basados en policloruros; el más utilizado, por económico, es el DEHP.

Los ftalatos son usados principalmente en adhesivos y pegamentos, materiales de construcción, suelos de vinilo, ceras, pinturas, barnices, electrodomésticos, embalajes, tintas de imprenta, artículos de limpieza y detergentes, productos textiles, productos de higiene personal y cosméticos (perfumes, sombra de ojos, coloretes, esmalte de uñas, jabones y lacas), instrumental médico y fármacos (catéteres y aparatos de transfusión sanguínea y en el recubrimiento de píldoras médicas para evitar su digestión gástrica y favorecer su absorción en intestino), productos alimenticios y suplementos nutricionales (para aumentar su consistencia y palatabilidad), contenedores de comida y vajillas, juguetes infantiles y juguetes sexuales.

Existen evidencias, para ambos productos, de su actividad como disruptores endocrinos; si bien los intereses comerciales derivados del uso de ambos productos mantienen una fuerte polémica. Polémica que llega al extremo de que, en el caso del bisfenol A, en la Unión Europea se considere seguro para humanos y animales y susceptible de ser utilizado en biberones y contenedores alimentarios, en Canadá se haya declarado sustancia peligrosa por el Gobierno y haya sido retirada por Wal-Mart, Nalgene y Toys-R-Us y en Estados Unidos, las seis empresas más fuertes del sector hayan retirado este producto para la fabricación de biberones infantiles y el Senado estudie su prohibición en contenedores alimentarios.

En el caso de los ftalatos, y concretamente el DEHP, su uso para la fabricación de juguetes infantiles ha sido prohibido en Estados Unidos, Japón y otros 14 países. En el caso de la Unión Europea, no se prohíbe su uso, pero se limita, junto a otros ftalatos, a menos de un 0,1% de la masa total del juguete y artículos de puericultura. En el momento actual, existen otras consideraciones sobre su uso en otros productos y objetos no estando permitido su uso en cosméticos en la Unión Europea (Directiva 2004/93/CE) debido a su clasificación como tóxico para la reproducción y con ciertas restricciones en los materiales en contacto con alimentos (Directiva de la UE 2007/19/CE); lo que no asegura la protección de neonatos y niños, ni la de adultos. Sin embargo, las evidencias sobre el papel de los

ftalatos no sólo como disruptores endocrinos, sino como disruptores metabólicos (actuando como sustancias obesogénicas y diabetogénicas), son cada día mayores.

Sobre la base de las consideraciones anteriores, por su amplio uso, su estrecha relación con la vida diaria y su población diana, el *estudio de las posibles acciones disruptoras del DEHP* fue elegido como el objetivo experimental de esta Memoria de Tesis Doctoral.

El mayor problema de los estudios científicos enfocados hacia el campo de la salud-enfermedad humana es que deben ser observacionales; criterios éticos impiden el desarrollo de estudios intervencionistas y mecanísticos. Por ello, los modelos animales son, hoy por hoy, la única alternativa. Los modelos animales más utilizados son los roedores; presentan pequeño tamaño, fácil manejo y mantenimiento, corto ciclo reproductivo y vital y, muy especialmente, son fáciles de manipular genéticamente. Por ello, han sido ampliamente utilizados en estudios de disrupción endocrina; principalmente, en aquellos relacionados con el desarrollo prenatal y neonatal. Sin embargo, presentan una serie de inconvenientes; el principal, las marcadas diferencias en el desarrollo y metabolismo con mamíferos de mayor tamaño y humanos. Estas diferencias son la base de los grupos de opinión que señalan la inconsistencia de las evidencias científicas sobre la acción disruptora de estas sustancias.

El uso de grandes animales puede ser una alternativa adecuada; éstos presentan, además, otras ventajas como el conocimiento de su genoma, la facilidad y economía de su alojamiento y manejo, sus patrones de comportamiento diurnos y su tamaño corporal, que permite la aplicación de técnicas de imagen y el fácil muestreo seriado de emuntorios y diferentes tejidos. Entre ellos, la oveja es considerada un buen modelo para el estudio de las características reproductivas en humana, debido a las estrechas similitudes en muchos aspectos de la fisiología reproductiva. Por otra parte, el seguimiento de la morfología y función ováricas, por ultrasonografía y valoración de niveles hormonales en muestras de sangre, es una

técnica bien establecida en esta especie. El tamaño corporal y el temperamento de estos animales, a diferencia de los roedores, permite repeticiones seriadas de muestreos cada pocos días o incluso diariamente en periodos más cortos; la oveja, es, por ello, una especie muy adecuada para el estudio de la ciclicidad ovárica. Y, por ello, la *oveja* ha sido el modelo animal elegido en este estudio.

Una vez identificado el contaminante y el modelo animal más adecuado para su estudio, debía establecerse el *protocolo experimental de exposición a DEHP*.

Para ello, en primer lugar, antes de la administración experimental de DEHP, se valoraron los niveles espontáneos, o basales, de DEHP en ovejas en condiciones de campo; animales no expuestos experimentalmente al compuesto. Los resultados que se obtuvieron, a partir de analíticas realizadas en más de 250 individuos seleccionados aleatoriamente en diferentes localizaciones, indican que alrededor de la mitad de las ovejas analizadas mostraron acumulación de DEHP y que esta acumulación aumentaba con la edad de los animales. Este dato es ya importante por sí mismo, ya que indica exposición a DEHP en animales que se suponen no tienen una relación directa con las fuentes habituales de exposición como los humanos. Sin embargo, más preocupante aún fue el hecho de que todas las ovejas preñadas mostraran evidencias de DEHP en plasma. Estudios previos señalan que la principal acumulación de DEHP se produce en el tejido adiposo debido a su alta liposolubilidad; estados de demanda metabólica como puede ser la gestación facilitarían la liberación del DEHP desde los depósitos grasos e incrementarían la cantidad circulante en plasma de este compuesto, pudiendo inducir toxicidad en procesos reproductivos y del desarrollo; este hallazgo refuerza la importancia de estudios, en grandes animales, sobre la exposición prenatal a ftalatos y su posible intervención en alteraciones endocrinas y metabólicas en edades adultas.

El segundo objetivo de este estudio fue el establecimiento, propiamente dicho, del protocolo de exposición a DEHP. Para ello, se realizó la determinación de los parámetros cinéticos de exposiciones cortas, menores de dos meses, a DEHP;

valorándose, además, la vía y el protocolo de administración y la dosis. En este estudio se concluía que la administración seriada, tres veces a la semana, de dosis intramusculares de DEHP es eficaz para mantener concentraciones estables en valores superiores a los niveles medio tras exposición no forzada al compuesto; observándose además, diferencias en el nivel en el equilibrio de concentración plasmática dependientes de la dosis de DEHP, 25 ó 50 mg/kg peso vivo. Por tanto, este protocolo se ha considerado adecuado para el diseño y utilización de un modelo ovino para el estudio de los efectos del DEHP sobre la función reproductiva femenina.

El primero de los estudios que tenían como objetivo la determinación del efecto de la exposición a DEHP, durante cortos periodos de tiempo, sobre la actividad reproductiva femenina utilizando como modelo experimental la oveja se basó en la evaluación de la actividad ovulatoria cíclica y las características morfométricas y funcionales del cuerpo lúteo, como indicadores de la aptitud reproductiva femenina. La evaluación morfométrica de la ovulación y la dinámica de crecimiento y regresión del cuerpo lúteo fue realizada por ultrasonografía transrectal. La funcionalidad luteal fue evaluada mediante la determinación de la concentración plasmática de progesterona en muestras de sangre. Ambas técnicas están bien establecidas en ganado ovino y se consideran técnicas experimentales de rutina; por otro lado, existe una alta correlación entre la imagen ultrasonográfica del cuerpo lúteo y su secreción de progesterona. Sin embargo, paradójicamente, los datos de ambas técnicas no se correspondían en el presente estudio.

El estudio ultrasonográfico mostró importantes alteraciones en la ciclicidad reproductiva, con aparición de ciclos sexuales de corta duración, debido a la presencia de cuerpos lúteos de pequeño tamaño y corta duración; estos efectos fueron dependientes de la dosis. Sobre la base de estudios anteriores, el nivel de secreción de progesterona por parte de estos cuerpos lúteos debería haber sido muy bajo. Sin embargo, los niveles medios de progesterona en plasma eran mayores en las ovejas expuestas a DEHP y que presentaban cuerpos lúteos

deficientes, que en las hembras control. Aún más, cuatro animales presentaron niveles de progesterona plasmática superiores a 20 ng/ml en todos sus ciclos; alcanzando, uno de ellos, valores de 52 ng/ml. Estos resultados daban lugar a la extrapolación de dos conclusiones y abrían dos nuevas vías de estudio a corto plazo.

En primer lugar, la exposición a DEHP produce efectos negativos sobre la ciclicidad ovárica y la función luteal; las deficiencias ovulatorias encontradas podrían deberse bien a un efecto negativo a nivel ovárico (afectando la función folicular preovulatoria o el desarrollo luteal posterior), o bien a un efecto negativo a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (afectando los mecanismos reguladores de GnRH y LH sobre la función luteal). Estos resultados y estas posibles causas fueron el punto de partida del cuarto experimento de la presente Memoria de Tesis Doctoral.

En segundo lugar, los altos niveles de progesterona plasmática, en presencia de cuerpos lúteos morfológicamente deficientes, podrían estar causados no por un incremento de su secreción, sino por una disminución en su metabolismo causada por alteraciones hepáticas. Es bien conocido que el DEHP afecta la funcionalidad hepática, aunque los procesos de carcinogénesis descritos en roedores sólo se produzcan en estas especies por diferencias metabólicas, y no en otras especies de mamíferos; y es bien conocido que un funcionamiento hepático alterado comprometerá el metabolismo de las hormonas esteroideas.

El cuarto experimento tuvo como objetivo dilucidar posibles mecanismos causantes de las alteraciones en la ciclicidad reproductiva previamente descritos. Primero, abordaba el estudio del efecto de la exposición a DEHP sobre los patrones de crecimiento (mediante ultrasonografía transrectal) y la funcionalidad (secreción de estradiol; evaluada sobre la base de las concentraciones plasmáticas de esta hormona) de los folículos preovulatorios. El desarrollo de los folículos preovulatorios y su efecto de dominancia sobre el resto de folículos en crecimiento fueron similares en ovejas control y en ovejas expuestas a DEHP. Sin embargo, coincidiendo con los resultados del tercer experimento que indicaban una falta de

coincidencia entre la morfología de los cuerpos lúteos y la progesteronemia, los niveles de estradiol fueron significativamente más altos en el grupo tratado con DEHP. La presencia de folículos hiperestrogénicos debería corresponderse con el desarrollo de patología quística anovulatoria; sin embargo, estos folículos presentaban un tamaño normal, alcanzaron la ovulación y dieron lugar a cuerpos lúteos en desarrollo. Estas características pudieran indicar que, como en el caso de la progesteronemia elevada, los altos niveles de estradiol en plasma se deberían a alteraciones en el metabolismo esteroideo hepático.

En el cuarto experimento se planteaba también la observación de variaciones morfológicas y endocrinas en la fase luteal temprana, durante el periodo de luteogénesis. En concreto se llevó a cabo, de nuevo, la evaluación morfométrica y funcional de la fase de crecimiento del cuerpo lúteo por ultrasonografía transrectal y determinación de la concentración plasmática de progesterona; en este caso, mediante observaciones diarias en un celo sincronizado. En el día 5 del ciclo inducido, identificado como crítico en las ovejas expuestas a DEHP en el anterior experimento, se determinó la secreción pulsátil de LH para valorar posibles alteraciones en la función hipofisaria y se obtuvieron los ovarios para llevar a cabo la valoración de posibles alteraciones tisulares en los cuerpos lúteos.

En forma similar a los resultados en cuanto crecimiento folicular, no se encontraron diferencias significativas en la imagen ultrasonográfica y la dinámica de crecimiento de los cuerpos lúteos entre ovejas control y expuestas a DEHP en los cinco primeros días del ciclo; a pesar de que en el día 5 ya se observa un ligero menor tamaño del tejido luteal en las ovejas tratadas. Asimismo, no se encontraron diferencias en el examen histológico de los cuerpos lúteos. Sin embargo, confirmando los resultados del experimento anterior, los niveles plasmáticos de progesterona fueron más altos en las hembras expuestas al ftalato.

Por el contrario, existieron diferencias significativas entre ambos grupos en las concentraciones basales y la pulsatilidad en la secreción de LH. Esta anomalía en

la secreción de LH pudiera ser la causa de las alteraciones en la ciclicidad reproductiva y las características de los cuerpos lúteos encontradas en el tercer experimento de esta Memoria; la LH es la hormona imprescindible en los procesos de luteogénesis y desarrollo folicular.

Sin embargo, estos resultados son, en sí mismos, controvertidos. La LH es también imprescindible en la fase folicular; para el desarrollo folicular terminal, para la maduración del folículo preovulatorio y para el desencadenamiento de la descarga preovulatoria de LH y, con ello, la ovulación. Un efecto negativo de la exposición a DEHP sobre la hipófisis que conllevara alteración en la secreción de LH conllevaría, asimismo, alteración en cualquiera de estos procesos; circunstancia que no se ha encontrado en el presente estudio. Sin embargo, estos procesos no se verían alterados si la disminución en la secreción de LH por exposición a DEHP fuera un efecto indirecto causado por altos niveles plasmáticos de progesterona; hormona que ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción y liberación de LH.

En el cuarto experimento, sobre la base de los resultados anteriores, se llevó a cabo la verificación de posibles alteraciones en la funcionalidad hepática que comprometiesen el metabolismo de la progesterona y, de esta forma, el adecuado funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que sustenta una actividad reproductiva normal. El análisis anatomopatológico de muestras de tejido hepático mostró evidencia de un proceso de hepatitis reactiva, con infiltración inflamatoria, degeneración grasa y necrosis; lesiones que son causa de una función hepática disminuida.

En conclusión, el análisis conjunto de los resultados encontrados en el desarrollo experimental de la presente Memoria de Tesis Doctoral muestra que la exposición de hembras adultas a DEHP, en dosis menores de las utilizadas en estudios previos y en corto periodo de tiempo, es suficiente para la inducción de alteraciones en la función reproductiva. Estas alteraciones se deben a la aparición de cuerpos lúteos

con un desarrollo defectivo que dan lugar a ciclos de corta duración; la aparición de estos ciclos parece relacionarse con deficiencias en la secreción de LH hipofisaria, imprescindible para el desarrollo luteal temprano. Sin embargo, esta deficiencia en la secreción de LH no parece ser debida a un efecto directo de DEHP sobre hipotálamo y/o hipófisis, sino a un efecto indirecto causado por un fallo hepático que comprometería el metabolismo de la progesterona; el mantenimiento de altos niveles de progesterona afectaría la liberación de LH y, con ello, los procesos de luteogénesis. Sin embargo, la enunciación axiomática de esta hipótesis exige el desarrollo de estudios específicos.

Por otro lado, los resultados de esta Memoria de Tesis generan la necesidad de estudios concretos sobre los efectos producidos por el DEHP sobre la secreción de gonadotropinas y esteroides y su repercusión en los fenómenos periovulatorios, en la competencia oocitaria para la fertilización y desarrollo de un embrión viable y en los procesos de diferenciación y proliferación celular a nivel oviductal y uterino que determinan el desarrollo embrionario temprano; es decir, en los procesos críticos para el éxito reproductivo que podrían estar afectados por la exposición a DEHP y que se relacionarían con los procesos de infertilidad señalados en mujeres expuestas a plastificantes.

5. CONCLUSIONES

1. La valoración de los niveles plasmáticos de DEHP en ovejas en condiciones de campo refleja una alta incidencia de animales con trazas de este compuesto, que se ve aumentada en animales de mayor edad y gestantes.
2. La administración de dosis múltiples de DEHP por vía intramuscular mantiene concentraciones plasmáticas del compuesto estables en equilibrio y en valores superiores a los niveles de exposición natural, siendo adecuada para el desarrollo de un modelo experimental para estudio de la toxicidad.
3. La exposición a DEHP con este protocolo afecta negativamente, en forma dosis-dependiente, a la ciclicidad ovárica y la función luteal; en concreto, induce la aparición de cuerpos lúteos de pequeño tamaño y corta duración. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de progesterona se ven aumentadas.
4. La exposición a DEHP no induce alteraciones en los patrones de crecimiento o la morfología de los folículos preovulatorios y los cuerpos lúteos en fase luteal temprana; sin embargo, se encuentran incrementadas las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona.
5. La exposición a DEHP se relaciona con alteraciones en las concentraciones basales y la pulsatilidad en la secreción de LH.
6. El análisis anatomopatológico y enzimático de la función hepática en hembras expuestas a DEHP evidencia alteraciones compatibles con fallo hepático.
7. La valoración conjunta de los datos referentes a morfología luteal, progesteronemia y función hepática parece indicar que el efecto negativo de la exposición a DEHP sobre la función ovárica se relacionaría con alteraciones en el metabolismo de la progesterona que provocarían la permanencia de altos niveles de esta hormona en sangre circulante y, con ello, alteraciones en la secreción de LH y en los mecanismos de luteogénesis.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams G. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl.* 54: 17–32.
2. Agarwal DK, Eustis S, Lamb IV JC, Reel JR, Kluwe WM. 1986. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology, and reproductive performance of male rats. *Environ. Health Perspect.* 65: 343-350.
3. Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. 2004. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 775-780.
4. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. 1982a. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ. Health Perspect.* 45: 19-25
5. Albro PW, Corbett JT. 1978. Distribution of di- and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in human plasma. *Transfusion.* 18: 750-755.
6. Albro PW, Hass JR, Peck CC, Odam DG, Corbett JT, Bailey FJ, Blatt HE, Barrett BB. 1981. Identification of the metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate in urine from the african green monkey. *Drug Metab. Disp.* 9: 223-225.
7. Albro PW, Jordan ST, Schroeder JL, Corbett JT. 1982b. Chromatographic separation and quantitative determination of the metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate from urine of laboratory animals. *J. Chromatograph.* 244, 65-79.
8. Albro PW, Lavenhar. 1989. Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metab Rev.* 21 :13-34.
9. Albro PW, Thomas RO. 1973. Enzymatic hydrolysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate by lipases. *Biochem. Biophys. Acta.* 360: 380-390.
10. Aldyreva MV, Klimove TS, Iziumova AS, Timofeevskaja LA. 1975. The effect of phthalate plasticizers on the generative function. *Gig Tr Prof Zabol.* 19: 25–29.
11. Allegrucci C, Hunter MG, Webb R, Luck MR. 2003. Interaction of bovine granulosa and theca cells in a novel serum-free co-culture system. *Reproduction.* 126: 527-538.

12. Alm H, Brussow KP, Torner H, Vanselow J, Tomek W, Danicke S, Tiemann U. 2006. Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reprod Toxicol.* 22: 44-50.
13. Alm H, Greising T, Brussow KP, Torner H, Tiemann U. 2002. The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. *Toxicol In Vitro.* 16: 643-648.
14. Alm H, Torner H, Tiemann U, Kanitz W. 1998. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro. *Reprod Toxicol.* 12: 559-563.
15. Anas MK, Suzuki C, Yoshioka K, Iwamura S. 2003. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod Toxicol.* 17:305-10.
16. Anderson WA, Castle L, Scotter MJ, Massey RC, Springall C. 2001. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Addit Contam.*18:1068-1074.
17. Arbuckle TE, Savitz DA, Mery LS, Curtis KM. 1999. Exposure to phenoxy herbicides and the risk of spontaneous abortion. *Epidemiology.* 10: 752-760.
18. Arcadi FA, Costa C, Imperatore C, Marchese A, Rapidisarda A, Salemi M, Trimarchi GR, Costa G. 1998. Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in Long-Evans rat. *Food Chem Toxicol.* 36: 963-970.
19. Armstrong DT, Papkoff H. 1976. Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 99:1144-11451.
20. ATSDR. Toxicological profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate(september 2002). Govt reports announcements&. 2003:07.
21. Axmon A, Rylander L, Stromberg U, Hagmar L. 2004. Altered menstrual cycles in women with a high dietary intake of persistent organochlorine compounds. *Chemosphere.* 56:813-819.
22. Badr MZ. 1992. Induction of peroxisomal enzyme activities by di-(2-ethylhexyl) phthalate in thyroidectomized rats with parathyroid replants. *J Pharmacol Exp Ther.* 263: 1105–10.

23. Baird DD, Newbold R. 2005. Prenatal diethylstilbestrol (DES) exposure is associated with uterine leiomyoma development. *Reprod Toxicol.* 20: 81-84.
24. Baird DT. 1983. Factors regulating the growth of the preovulatory follicle in the sheep and human. *J Reprod Fertil.* 69: 343-352.
25. Baird DT. 1992. Luteotrophic control of the corpus luteum. *Anim Reprod Sci.* 28:95-110.
26. Barr DB, Silva MJ, Kato K, Reidy JA, Malek NA, Hurtz D, Sadowski M, Needham LL, Calafat AM. 2003. Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. *Env. Health Perspect.* 111: 1148-1151
27. Barreiro R, Quintela M, Ruiz JM. 1999. Aphally and imposex in *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): incidence, geographical distribution and consequences for the biomonitoring of TBT contamination. *Marine Ecology Progress Series* 185:229-238.
28. Barreiro R., Ruiz JM, Quintela M. 1998. Respuesta a la contaminación por TBT en individuos trasplantados de *Nucella lapillus* (L.) desde zonas poco contaminadas a los puertos de Ferrol y A Coruña. *Cuadernos de Investigación en Biología.* Bilbao. Vol 20: 279-282.
29. Bartlewsky PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC. 1999. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Fertil.* 115: 111-124.
30. Becker K, Seiwert M, Angerer J, Heger W, Koch HM, Nagorka R, Roskamp E, Schlüter C, Seifert B, Ullrich D. 2004. DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *Int J Hyg. Environ Health.* 207: 409-417.
31. Ben-Shlomo Y, Kuh D. 2002. A life course approach to chronic disease epidemiology: conceptual models, empirical challenges and interdisciplinary perspectives. *Int J Epidemiol.* 31:285-93.
32. Berisha B, Schams D. 2005. Ovarian function in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology.* 29: 305-317.

33. Berman E, Laskey JW. 1993. Altered steroidogenesis in whole-ovary and adrenal culture in cycling rats. *Reprod Toxicol.* 7: 349-58.
34. Bigsby RM, Caperell-Grant A, Madhucar BV. 1997. Xenobiotics released from fat during fasting produce estrogenic effects in ovariectomized mice. *Cancer Res.* 57: 865-869.
35. Birnbaum LS, Cummings AM. 2002. Dioxins and endometriosis: a plausible hypothesis. *Environ Health Perspect.* 110: 15-21. Review.
36. Blanck HM, Marcus M, Rubin C, Tolbert PE, Hertzberg VS, Henderson AK, Zhang RH. 2002. Growth in girls exposed in utero and postnatally to polybrominated biphenyls and polychlorinated biphenyls. *Epidemiology.* 13: 205-210.
37. Bloch M, Rubinow DR, Schmidt PJ, Lotsikas A, Chrousos GP, Cizza G. 2005. Cortisol response to ovine corticotropin-releasing hormone in a model of pregnancy and parturition in euthymic women with and without a history of postpartum depression. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 695-699.
38. Blount BC, Silva MJ, Caudill SP, Needham LL, Pirkle JL, Sampson EJ, Lucier GW, Jackson RJ, Brock JW. 2000. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environmental Health Perspectives.* 108: 979-982.
39. Boerjan ML, Freijnagel S, Rhind SM, Meijer GAL. 2002. The potential reproductive effects of exposure of domestic ruminants to endocrine disrupting compounds. *Anim Sci.* 74: 3-12.
40. Bordes A, Lornage J, Demirci B, Franck M, Courbiere B, Guerin JF, Salle B. 2005. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrifiedwarmed hemi-ovaries into ewes. *Hum Reprod.* 20: 2745-2748.
41. Borgeest C, Greenfeld C, Tomic D, Flaws JA. 2002. The effects of endocrine disrupting chemicals on the ovary. *Frontiers in Bioscience.* 7: 1941-1948.
42. Borowczyk E, Johnson ML, Bilski JJ, Bilska MA, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. 2007. Role of gap junctions in regulation of progesterone secretion by ovine luteal cells in vitro. *Reproduction.* 133: 641-651.

43. Boylan ES, Calhoon RE. 1981. Prenatal exposure to diethylstilbestrol: ovarian-independent growth of mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Natl Cancer Inst.* 66: 649-52.
44. Bretveld RW, Thomas CMG, Scheepers PTJ, Zielhuis GA, Roeleveld N. 2006. Pesticide exposure: the hormonal function of the females reproductive system disrupted?. *Repro Biol Endocrinol.* 4: 30-42.
45. Brevini TAL, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F. 2005. Effects of endocrine disrupters on the oocytes and embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim.* 40: 291-299.
46. Bronsch CJT. 1987. Untersuchungen zur Exposition und zum renalen Ausscheidungsverhalten des Kunststoffweichmachers di-(2-ethylhexyl) phthalat (DEHP) beim Menschen. Dissertation No. 8459, Eidgenoessische Technische Hochschule, Zuerich, Switzerland.
47. Bryan G W, Gibbs P E, Burt GR, Hummerstone LG. 1987. The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dogwhelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. *Journal .of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 67: 525-544.
48. Cahill LP, Mauleón P. 1981. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *J Reprod Fertil.* 61: 201-206.
49. Calabrese EJ. 1986. Sex differences in susceptibility to toxic industrial chemicals. *Br J Ind Med.* 43: 577-579.
50. Calafat AM, Brock JW, Silva MJ, Earl Gray LJr, Reidy JA, Barr DB, Needham LL. 2006a. Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate. *Toxicology.* 217: 22-30.
51. Calafat AM, McKee RH. 2006b. Integrating biomonitoring exposure data into the risk assessment process: phthalates [dietyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate] as a case study. *Environmental Health Perspectives.* 114: 1783-1789.

52. Calafat AM, Needham LL, Silva MJ, Lambert G. 2004a. Exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics*. 113:429-434.
53. Calafat AM, Slakman AR, Silva MJ, Herbert AR, Needham LL. 2004b. Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *J Chromatography B*. 805: 49-56.
54. Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R. 1995. Control of follicle development and selection in sheep and cattle. *J Reprod Fertil Suppl*. 49:335–350.
55. Campbell BK, Souza C, Gong J, Webb R, Kendall N, Marsters P, Robinson G, Mitchell A, Telfer EE, Baird DT. 2003. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reprod Suppl*. 61: 429-43.
56. Can A, Semiz O, Cinar O. 2005. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Mol Hum Reprod*. 11: 389-396.
57. Can A, Semiz O. 2000. Diethylstilbestrol (DES)-induced cell cycle delay and meiotic spindle disruption in mouse oocytes during in-vitro maturation. *Mol Hum Reprod*. 6: 154–62.
58. Carpenter D, Weil CS, Smyth SF. 1953. Chronic oral toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate for rats, guinea pigs and dogs. *Arch Ind Hyg*. 8: 219-26.
59. Cattley RC, DeLuca J, Elcombe C, Fenner-Crisp P, Lake BG, Marsman DS, Pastoor TA, Popp JA, Robinson DE, Schwetz B, Tuggwood J, Wahli W. 1998. Do peroxisome proliferating compounds pose a hepatocarcinogenic hazard to humans? *Reg Toxicol Pharmacol*. 27: 47-60.
60. Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR). 2006. NPT-CERHR Monograph on the potencial human reproductive and developmental effects of Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). NIH publ. 06-4476.
61. CSTEE. 2004. EU Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. Opinion on the results of the Risk Assessment of bis(2-

- ethylhexyl)phthalate. Opinion expressed at the 41st CSTE plenary meeting Brussels, 8 January 2004.
62. Chao HR, Wang SL, Lin LY, Lee WJ, Papke O. 2007. Placental transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in Taiwanese mothers in relation to menstrual cycle characteristics. *Food Chem Toxicol.* 45: 259-65.
 63. Clark K, Cousin IT, Mackay D, Yamada K. 2003b. Observed concentrations in the environment. In: C. A. Staples, Ed. *The handbook of environmental chemistry*.ed. New York: Springer-verlag. 125-177.
 64. Clark K, Cousin IT, Mackay D. 2003a. Assessment of critical exposure pathways. In: C. A. Staples, Ed. *The handbook of environmental chemistry*.ed. New York: Springer-verlag. 227-262.
 65. Clausen PA, Hansen V, Gunnarsen L, Afshari A, Wolkoff P. 2004. Emission of di-2-ethylhexylphthalate from PVC flooring into air and uptake in dust: Emission and sorption experiments in FLEC and CLIMPAQ. *Environ Sci. Technol.* 38: 2531-2537.
 66. CMA 1984b. A 21 day dose-relationship study of di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. TSCATS: OTS 0508501, Doc. I. D.: 40-8526196, 07-01-84, Chemical Manufacturers Association; TSCATS: OTS 0509537, Doc. I. D.: 40- 8526206, 07-01-84, Chemical Manufacturers Association; TSCATS: OTS 0536220, New Doc. I. D.: 88-920002026, 07-01-84, Chemical Manufacturers Association.
 67. CMA 1984c. Chemical Manufacturers Assoc.: Assessment of possible carcinogenic risk resulting from exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in children's products, 07-09-84.
 68. Cobellis L, Latini G, De Felice C, Razzi S, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P, Petraglia F. 2003. High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 18: 1512-1515.
 69. Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology.* 59: 171-188.

70. Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM, Sholtz RI. 2007. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environ Health Perspect.* 115: 1406–1414.
71. Colborn T, Smolen MJ. 1996. Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in cetaceans. *Rev Environ Contam Toxicol.* 146: 91-172. Review.
72. Colborn T, Von Saal FS, Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health and Perspectives.* 101: 378-384.
73. Collins, TFX. 2006. History and evolution of reproductive and developmental toxicology guidelines. *Current Pharmaceutical Design.* 12: 1449-1465.
74. Cook JD, Davis BJ, Cai SL, Barrett JC, Conti CJ, Walker CL. 2005. Interaction between genetic susceptibility and early-life environmental exposure determines tumor-suppressor-gene penetrance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 8644-8649.
75. Cook JD, Davis BJ, Goewey JA, Berry TD, Walker CL. 2007. Identification of a sensitive period for developmental programming that increases risk for uterine leiomyoma in Eker rats. *Reprod Sci.* 4: 121-136.
76. Cooper GS, Klebanoff MA, Promislow J, Brock JW, Longnecker MP. 2005. Polychlorinated biphenyls and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology.* 16: 191-200.
77. Cortvrind RG, Smitz JEJ. 2002. Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in-vitro testing of ovarian function? *Hum Reprod Update.* 3: 243-254.
78. Crain DA, Janssen SJ, Edwards TM, Heindel J, Ho SM, Hunt P, Iguchi T, Juul A, McLachlan JA, Schwartz J, Skakkebaek N, Soto AM, Swan S, Walker C, Woodruff TK, Woodruff TJ, Giudice LC, Guillette LJ Jr. 2008. Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril.* 90: 911-940.
79. Cummings AM, Hedge JM, Birnbaum LS. 1999. Effect of prenatal exposure to TCDD on the promotion of endometriotic lesion growth by TCDD in adult female rats and mice. *Toxicol Sci.* 52: 45-49.

80. Curtis KM, Savitz DA, Weinberg CR, Arbuckle TE. 1999. The effect of pesticide exposure on time to pregnancy. *Epidemiology*. 10: 112-117.
81. Daniel JW, Bratt H. 1974. The absorption, metabolism and tissue distribution of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicol*. 2: 51-65.
82. David RM. 2004. Commentary regarding the article by Koch et al.: an estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and others phthalates in the general population. *Int J. Hyg. Environ health* 2003; 206: 77-83. *Int J. Hyg Environ health*. 207: 75-76; author reply 77-78.
83. Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. 1994. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 128: 216-223.
84. Davis J, Rueda B, Spanel-Borowski K. 2003. Microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1: 1-15.
85. Denham M, Schell LM, Deane G, Gallo MV, Ravenscroft J, DeCaprio AP. 2005. Relationship of lead, mercury, mirex, dichlorodiphenyldichloroethylene, hexachlorobenzene, and polychlorinated biphenyls to timing of menarche among Akwesasne Mohawk girls. *Pediatrics*. 115: 127-134.
86. Denschlag D, Knobloch C, Kockrow A, Baessler A, Goebel H, Wellens E, Haberstroh J, Tempfer C, Keck C. 2005. Autologous heterotopic transplantation of ovarian tissue in sheep. *Fertil Steril*. 83: 501-503.
87. Derfoul A, Lin FJ, Awumey EM, Kolodzeski T, Hall DJ, Tuan RS. 2003. Estrogenic endocrine disruptive components interfere with calcium handling and differentiation of human trophoblast cells. *J Cell Biochem*. 89: 755-770.
88. Dostal LA, Weaver RP, Schwetz BA. 1987a. Transfer of di(2-ethylhexyl) phthalate through rat milk and effects on milk composition and the mammary gland. *Toxicol Appl Pharmacol*. 91: 315-325.
89. Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, Williams G, van Gemert M. 1999. A Cancer Risk Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate: Application of the new US EPA Risk Assessment Guidelines. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 29: 327-357.

90. Eastman Kodak. 1992. A subchronic (13-week) dietary oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in Fischer 344 rats (final report). TSCATS: OTS 0530371, Doc. I. D.: 89-910000085, 03-14-91, Eastman Kodak Co.
91. ECB (European Chemicals Bureau). 2008. European Union Risk Assessment Report. Bis(2- ethylhexyl)phthalate (DEHP). European Communities. 2nd Priority List Volume: 80, 588 pg.
92. EFSA Journal. 2005. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. Question N° EFSA-Q-2003-191.
93. EMEA. CHMP/203927/2005: Guideline on risk assessment of medical products on human reproduction and lactation: from data to labelling.
94. Eskenazi B, Warner M, Marks AR, Samuels S, Gerthoux PM, Vercellini P, Olive DL, Needham L, Patterson D Jr, Mocarelli P. 2005. Serum dioxin concentrations and age at menopause. *Environ Health Perspect.* 113: 858-62.
95. Eskenazi B, Warner M, Mocarelli P, Samuels S, Needham LL, Patterson DG Jr, Lippman S, Vercellini P, Gerthoux PM, Brambilla P, Olive D. 2002. Serum dioxin concentrations and menstrual cycle characteristics. *Am J Epidemiol.* 156: 383-392.
96. Evans ACO, Duffy P, Hynes N, Boland MP. 2000. Waves of follicles development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology.* 53: 699-715.
97. Evans ACO. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Dom Anim.* 38: 240-246.
98. Farin CE, Sawyer HR, Niswender GD. 1989. Analysis of cell types in the corpus luteum of the sheep. *J Reprod Fertil (Suppl).* 37: 181-187.
99. Faure MO, Nico L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A, Taragnat C. 2005. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *Journal of Endocrinology.* 186: 109-121.
100. Field PA. 1991. Relaxin and other luteal secretory peptides: cell localization and function in the ovary. In: *Ultrastructure of the ovary.* G. Familiari, S. Makabe and P.M. Motta (Eds.). Kluwer Academic Press, Boston. Pp. 177-198.

101. Fitz TA, Mayan H, Sawyer M, Niswender GD. 1982. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 27: 703-711.
102. Fortune JE, Quirk SM. 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J Anim Sci.* 66: 1-8.
103. Fraser H, Wulff C. 2003. Angiogenesis in the corpus luteum. *Reproductive biology and endocrinology.* 1: 1-8.
104. Fromme H, Bolte G, Koch HM, Angerer J, Boehmer S, Drexler H, Mayer R, Liebl B. 2007. Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int J Hyg Environ Health.* 210: 21-33.
105. Ganning AE, Olsson MJ, Brunk U, Dallner G. 1990. Effects of prolonged treatment with phthalate ester on rat liver. *Pharmacol Toxicol.* 68: 392-401.
106. Garverick HA, Smith MF. 1986. Mechanisms associated with subnormal luteal function. *J Anim Sci.* 62: 92-105.
107. Gerhard I, Runnebaum B. 1992. The limits of hormone substitution in pollutant exposure and fertility disorders. *Zentralbl Gynakol.* 114:593-602. Review.
108. Gibaldi M, Perrier D. 1982. *Pharmacokinetics*, second ed. Marcel Dekker, Inc. NY, USA.
109. Gibbs P E, Bryan G W. 1986. Reproductive failure in populations of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 66: 767-777.
110. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. 1995. Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology.* 43: 689-703.
111. Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE. 1995. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med.* 122: 778-788.
112. Gonzalez de Bulnes A, Santiago Moreno J, Garcia Lopez M, Gomez Brunet A, Lopez Sebastian A. 1994. Observacion de1 ovario en la oveja y eficacia en la deteccion de foliculos y cuerpos lúteos mediante ecografia transrectal. *Invest Agr.* 9: 319-329.

113. Gonzalez-Añoover P, Gonzalez-Bulnes A, Veiga-Lopez A, Garcia-Garcia RM, McNeilly AS, Encinas T. 2006. Effects of growth hormone and gonadotrophin releasing hormone antagonists on ovarian follicle growth in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* 29: 373-377.
114. Gonzalez-Bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, Garcia-Garcia RM, Inskoop EK, López-Sebastián A, McNeilly AS, Santiago-Moreno J, Souza CJ, Veiga-López A. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev*. 16: 421-435.
115. Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Gomez-Brunet A, Lopez-Sebastian A. 2000. Relationship between Ultrasonographic Assessment of the Corpus Luteum and Plasma Progesterone Concentration during the Oestrous Cycle in Monovular Ewes. *Reprod Dom Anim*. 35: 65-68.
116. Gonzalez-Bulnes A, Veiga-Lopez A, Garcia P, Garcia-Garcia RM, Ariznavarreta C, Sanchez MA, Tresguerres JAF, Cocero MJ, Flores JM. 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*. 63: 2523-2534.
117. Goodman AL, Hodgen GD. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res*. 39: 1-73.
118. Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, Grote K, Chahoud IA. 2006. Dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate: effects on female rat reproductive development *Toxicol Sci*. 91: 247-54.
119. Gray LE Jr, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DN, Parks L. 2000. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci*. 58: 350-365.
120. Gray LE Jr, Wolf C, Lambricht C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J. 1999. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane

- sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the rat. *Toxicol Ind Health*. 15: 94-118.
121. Gray TJB, Butterworth KR, Gaunt LE, Grasso P, Gangolli SD. 1977. Short-term toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Fd Cosmet Toxicol*. 15: 389-399.
122. Gray TJB, Butterworth KR. 1980. Testicular atrophy produced by phthalate esters. *Arch Toxicol Suppl*. 4: 452-455.
123. Gray TJB, Rowland IR, Foster PMD, Gangolli SD. 1982. Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol Lett*. 11: 141-147.
124. Grazul-Bliska AT, Reynolds LP, Redmer DA. 1997. Minireview: gap junctions in the ovaries. *Biol Reprod*. 57: 947-957.
125. Green R, Hauser R, Calafat AM, Weuve J, Schettler T, Ringer S, Huttner K, Hu H. 2005. Use of di(2-ethylhexyl) phthalate containing medical products and urinary levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care units. *Environ Health Perspect*. 113: 1222-1225.
126. Greenwald GS. 1999. Luteotropic Hormones. En: Knobil (ed) *Encyclopedia of Reproduction*. v2: 1095-1105. Academic Press.
127. Griffiths WC, Camara PD, Saritelli A, Gentile J. 1988. The in vitro serum protein binding characteristics of bis(2-ethylhexyl)phthalate and its principal metabolite, mono(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect*. 77: 151-156.
128. Guillete LJ Jr, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect*. 102, 680-688.
129. Gunnarsson D, Leffler P, Ekwurtzel E, Martinsson G, Liu K, Selstam G. 2008. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate stimulates basal steroidogenesis by a cAMP-independent mechanism in mouse gonadal cells of both sexes. *Reproduction*. 135: 693-703.
130. Hanawa T, Muramatsu E, Asakawa K, Suzuki M, Tanaka M, Kawano K, Seki T, Juni K, Nakajima S. 2000. Investigation of the release behavior of diethylhexyl

- phthalate from the polyvinyl-chloride tubing for intravenous administration. *Int J Pharm.* 210: 109-115.
131. Harrison LM, Kenny N, Niswender G. 1987. Progesterone production, LH receptors, and oxytocin secretion by ovine luteal cell types on days 6, 10 and 15 of the oestrous cycle and day 25 of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility.* 79: 539-548.
 132. Hauser R, Meeker JD, Park S, Silva MJ, Calafat AM. 2004. Temporal variability of urinary phthalate metabolite levels in men of reproductive age. *Environ Health Perspect.* 112: 1734-1740.
 133. Heath RG, Spann JW, Kreitzer JF. 1969. Marked DDE impairment of mallard reproduction in controlled studies. *Nature.* 224: 47-48.
 134. Heath RG. 1969. Nationwide residues of organochlorine pesticides in wings of mallards and black ducks. *Pestic Monit J.* 3: 115-23.
 135. Herreros MA, Encinas T, Iñigo-Nuñez S, Letelier CA, Contreras-Solis I, Ros JM, Gonzalez-Bulnes A. Dose-dependant effects of the endocrine disruptor di(2-ethylhexyl) phthalate on the ovarian cyclicity, corpora lutea dynamics and plasma progesterone concentration of a sheep model. *Biol Reprod.*
 136. Heudorf U, Mesch-sundermann V, Angerer J. 2007. Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health.* 210: 623-634.
 137. Hickey JJ, Anderson DW. 1968. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science.* 162: 271-273
 138. Hinton RH, Mitchell FE, Mann A, Chescoe D, Price SC, Nunn A, Grasso P, Bridges JW. 1986. Effects of phthalic acid esters on the liver and thyroid. *Environ Health Perspect* 70: 195-210.
 139. Hirosawa N, Yano K, Suzuki Y, Sakamoto Y. 2006. Endocrine disrupting effect of di-(2-ethylhexyl)phthalate on female rats and proteome analyses of their pituitaries. *Proteomics.* 6: 958-971.
 140. Högberg J, Hanberg A, Berglund M, Skerfving S, Remberger M, Calafat AM, Filipsson AF, Jansson B, Johansson N, Appelgren M, Hakansson H. 2008. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or

- serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Persp* 116:334-339.
141. Hoyer PB. 2005. Damage to ovarian development and function. *Cell and tissue Research*. 322: 99-106.
142. Huber WW, Grasl-Kraup B, Schulte-Hermann R. 1996. Hepatocarcinogenic Potential of Di(2-ethylhexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk. *Critical Reviews in Toxicol*. 26: 365-480.
143. Huirne JA, Lambalk CB. 2001 Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *Lancet*. 358:1793-803. Review
144. Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, Thomas S, Thomas BF, Hassold TJ. 2003. Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol*. 13: 546–553.
145. Hunter MG. 1991. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *J Reprod Fertil Suppl*. 43: 91-99.
146. IARC. 1995. International Agency for Research on Cancer. Peroxisome Proliferation and its role in Carcinogenesis, views and expert opinions of an IARC Working Group Lyon, 7-11 Dec 1994, IARC Technical Report No.24 Lyon.
147. ICI 1982. Di(2-ethylhexyl) phthalate: a comparative subacute toxicity study in the rat and marmoset. TSCATS:215194, Doc. I. D.: 87-8220040, 05-11-82, ICI Americas Inc.
148. Iguchi T, Takasugi N. 1986. Polyovular follicles in the ovary of immature mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Anat Embryol (Berl)*. 175: 53-55.
149. Iguchi T. 1985. Occurrence of polyovular follicles in ovaries of mice treated neonatally with diethylstilbestrol. *Proc Japan Acad*. 61B: 288-291.
150. Ikeda GJ, Sapezza PP, Couvillion JL, Farber TM, van Loon EJ. 1980. Comparative distribution, excretion and metabolism of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats, dogs and miniature pigs. *Food Cosmet Toxicol*. 18: 637-642.
151. Ireland JJ, Roberts RM, Palmer GH, Bauman DE, Bazer FW. 2008. A commentary on domestic animals as dual-purpose models that benefit agricultural and biomedical research. *J Anim Sci*. 86: 2797-2805.

152. Ireland JJ, Roche JF. 1982. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 111: 2077-2086.
153. Ireland JJ, Roche JF. 1983. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*. 112: 150-156.
154. Ito Y, Yokota H, Wang R, Yamanoshita O, Ichihara G, Wang H, Kurata Y, Takagi K, Nakajima T. 2005. Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch Toxicol*. 79: 147-154.
155. Jaakkola JJ, Oie L, Nafstad P, Botten G, Samuelsen SO, Magnus P. 1999. Interior surface materials in the home and the development of bronchial obstruction in young children in Oslo, Norway. *Am J Pub Health*. 89: 118-192.
156. Jacobson MS, Kevy SV, Grand RJ. 1977. Effects of a plasticizer leached from polyvinyl chloride on subhuman primate consequence of chronic transfusion therapy. *J Lab Clin Med* 89: 1066-1079.
157. Jarosová A, Gajdusková V, Raszyk J, Sevela K. 1999. Di-2-ethylhexyl phthalate and di-n-butyl phthalate in the tissues of pigs and broiler chicks after their oral administration. *Vet Med Czech*. 44: 61-70.
158. Jefferies JA, Robboy SJ, O'Brien PC, Bergstralh EJ, Labarthe DR, Barnes AB, Noller KL, Hatab PA, Kaufman RH, Townsend DE. 1984. Structural anomalies of the cervix and vagina in women enrolled in the Diethylstilbestrol Adenosis (DESAD) Project. *Am J Obstet Gynecol*. 148: 59-66.
159. Jefferson WN, Couse JF, Padilla-Banks E, Korach KS, Newbold RR. 2002. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod*. 67:1285-1296.
160. Jefferson WN, Padilla-Banks E, Newbold RR. 2005. Adverse effects on female development and reproduction in CD-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally relevant doses. *Biol Reprod*. 73: 798-806.

161. Jefferson WN, Padilla-Banks E, Newbold RR. 2007. Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein. *Reprod Toxicol.* 23: 308-316.
162. Jobling, S, Sumpter JP. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in-vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology.* 27: 361-372.
163. Johansson M, Nilsson S, Lund BO. 1998. Interactions between methylsulfonyl PCBs and the glucocorticoid receptor. *Environ Health Perspect.* 106: 769-772.
164. Jones HB, Garside DA, Liu R, Roberts JC. 1993. The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function in vitro and in vivo. *Exp Mol Pathol.* 58: 179-193.
165. Juengel JL, Niswender GD. 1999. Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. *J Reprod Fertil Suppl.* 54: 193-205. Review
166. Kaczmarek M, Schams D, Ziecik A. 2005. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology-an overview. *Reproductive Biology.* 5: 111-136.
167. Kambia K, Dine T, Gressier B, Germe AF, Luyckx M, Brunet C, Michaud L, Gottrand F. 2001. High-performance liquid chromatographic method for the determination of di(2-ethylhexyl) phthalate in total parenteral nutrition and in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 755: 297-303.
168. Karsch FJ, Battaglia DF. 2002 . Mechanisms for endotoxin-induced disruption of ovarian cyclicity: observations in sheep. *Reproduction (Cambrid, England) Suppl.* 59: 101-113.
169. Kavlock RJ, Ankley GT. 1996. A perspectiva on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Analysis.* 16: 731-739.
170. Keisler DH, Keisler LW. 1989. Formation and function of GnRH induced subnormal corpora lutea in cyclic ewes. *J Reprod Fertil.* 87: 267-273.
171. Kessler W, Numtip W, Grote K, Csanády GA, Chahoud I, Filser JG. 2004. Blood burden of di(2-ethylhexyl) phthalate and its primary metabolite mon(2-ethylhexyl) phthalate in pregnant and nonpregnant rats and marmosets. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 195: 142-153.

172. Kessler W, Phokha W, Casanady GA, Filser JG. 2001. No background concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in brood of rats. *Arch Toxicol.* 75: 62-64.
173. Keyes P, Wiltbank C. 1988. Endocrine regulation of the corpus luteum. *Annual Reviews Physiology.* 50: 465-482.
174. Keys DA, Wallace DG, Kepler TB, Conolly RB. 1999. Quantitative evaluation of alternative mechanisms of blood and testes disposition of di(e-ethylhexyl) phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicological Sciences.* 49: 172-185.
175. Kirigaya A, Hayashi S, Iguchi T, Sato T. 2006. Developmental effects of ethinylestradiol on reproductive organs of female mice. *In Vivo.* 20:867-73.
176. Koch HM, Angerer J, Drexler H, Eckstein R, Weisbach V. 2005a. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure of voluntary plasma and platelet donors. *Int J Hyg Environ Health.* 208: 489-498.
177. Koch HM, Bolt HM, Angerer J. 2004a. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol.* 78: 123-130.
178. Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. 2005b. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol.* 79: 367-76.
179. Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Eckstein R, Weisbach V, Angerer J. 2005c. Intravenous exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation. *Arch Toxicol.* 79: 689-693.
180. Koch HM, Drexler H, Angerer J. 2003a. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Environ Health* 206: 77-83.
181. Koch HM, Drexler H, Angerer J. 2004b. Internal Exposure of Nursery-School Children and their Parents and Teachers to Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Int J Hyg Environ Health.* 207: 15-22.
182. Koch HM, Drexler H, Angerer J. 2004c. Response to de letter of RM David. *Int J Hyg Environ health* (2003) 207: 75-76. *Int J Hyg Environ Health.* 207: 77-78.

183. Koch HM, Preuss R, Angerer J. 2006. Di(2ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure – an update and latest results. *International Journal of Andrology*. 29: 155-165.
184. Koch HM, Rossbach B, Drexler H, Angerer J. 2003b. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates—determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ. Res.* 93: 177-185.
185. Kohn MC, Parham F, Masten SA, Portier CJ, Shelby MD, Brock JW, Needham LL. 2000. Human exposure estimates for phthalates. *Environ Health Perspect.* 108: A440-442.
186. Koo HJ, Lee BM. 2005. Human monitoring of phthalates and risk assessment. *J Toxicol Environ Health*. 68: 1379-1392.
187. Koo HJ, Lee BM. 2007. Toxicokinetic relationship between di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 70: 383-387.
188. Kovadanti PR; Tilson HA. 1997. Structure-activity relationships of potentially neurotoxic PCB congeners in the rat. *Neurotoxicology*. 18: 425-441.
189. Kurata Y, Kidachi F, Yokoyama M, Toyota N, Takano K, Tsuchitani M, Katho M. 1996. 13-week repeated-dose oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in common marmoset. Mitsubishi Chemical Safety Institute, preliminary report.
190. Kurata Y, Kidachi F, Yokoyama M, Toyota N, Tsuchitani M, Katoh M. 1998. Subchronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in common marmosets: lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia. *Toxicol Sci*. 42: 49-56.
191. Kurata Y, Kidate F, Tsuchiya M, Yokoyama M, Toyoda N, Takano K. 1995. Thirteen week repetitive oral administration test of di(2-ethylhexyl)phthalate using marmosets. Test number 4L209. Mitsubishi Chemical Co., Safety Science Laboratories.

192. Lake BG, Brantom PG, Gangolli SD, Butterworth KR, Grasso P. 1976. Studies on the effects of orally administered di-(2-ethylhexyl)phthalate in the ferret. *Toxicol.* 6: 341-356.
193. Lake BG, Gray TJB, Foster JR, Stubberfield CR, Gangolli SD. 1984. Comparative studies on di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatic peroxisome proliferation in the rat and hamster. *Toxicol Appl Pharmacol.* 72: 46-60.
194. Lake BG, Phillips JC, Linnell PJ, Gangolli SD. 1977. The in vitro hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxicol Appl Pharmacol.* 39: 239-248.
195. Lamb JC 4th, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR. 1987. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 88: 255-269.
196. Laskey JW, Berman E. 1993. Steroidogenic assessment using ovary culture in cycling rats: effects of bis(2-diethylhexyl)phthalate on ovarian steroid production. *Reprod Toxicol.* 7: 25-33.
197. Latini G. 2007. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chim Acta.* 361:20-29.
198. Law DC, Klebanoff MA, Brock JW, Dunson DB, Longnecker MP. 2005. Maternal serum levels of polychlorinated biphenyls and 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and time to pregnancy. *Am J Epidemiol.* 162:523-532.
199. Lawrence WH, Malik M, Turner JE, Singh AR, Autian J. 1975. A toxicological investigation of some acute, short-term, and chronic effects of administering di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and other phthalate esters. *Environ Res.* 9: 1-11.
200. Lee J, Park J, Jang B, Knudsen TB. 2004. Altered expression of genes related to zinc homeostasis in early mouse embryos exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Toxicol Lett.* 152:1-10.
201. Leyva V, Buckrell BC, Walton JS, 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology.* 50: 395-416.

202. Leoni V, Fabiani L, Marinelli G, Puccetti G, Tarsitani GF, De CA, Vescia N, Morini A, Aleandri V, Pozzi V. 1989. PCB and other organochlorine compounds in blood of women with or without miscarriage: a hypothesis of correlation. *Ecotoxicol Environ Saf.* 17: 1-11.
203. Letelier C, Garcia-Fernandez RA, Contreras-Solis I, Sanchez MA, Garcia-Palencia P, Sanchez B, Gonzalez-Bulnes A, Flores JM. 2009. Progestogen treatments for cycle management in a sheep model of assisted conception affect the growth patterns, the expression of luteinizing hormone receptors, and the progesterone secretion of induced corpora lutea. *Fertil Steril*; in press.
204. Li L-H, Jester WF Jr, Orth JM. 1998. Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 153: 258-265.
205. Liang DW, Zhang T, Fang HH, He J. 2008. Phthalates biodegradation in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80: 183-198.
206. Lind PM, Milnes MR, Lundberg R, Bermudez D, Orberg JA, Guillette LJ Jr. 2004. Abnormal bone composition in female juvenile American alligators from a pesticide-polluted lake (Lake Apopka, Florida). *Environ Health Perspect.* 112 :359-362.
207. Lindgren A, Lindquist NG, Lydén A, Olsson T, Ullberg S. 1982. A whole body autoradiographic study on the distribution of ¹⁴C-labelled di(2-ethylhexyl) phthalate in mice. *Toxicol.* 23: 149-158.
208. Ljungvall K, Tienpont B, David F, Magnusson U, Törneke K. 2004. Kinetics of orally administered di(2-ethylhexyl) phthalate and its metabolite, mono(2-ethylhexyl) phthalate, in male pigs. *Arch Toxicol.* 78: 384-389.
209. Ljungvall K, Karlsson P, Hultén F, Madej A, Norrgren L, Einarsson S, Rodriguez-Martinez H, Magnusson U. 2005. Delayed effects on plasma concentration of testosterone and testicular morphology by intramuscular low-dose di(2-ethylhexyl)phthalate or oestradiol benzoate in the prepubertal boar. *Theriogenology.* 64:1170-1184.
210. Loganathan BG, Kannan K. 1994. Global organochlorine contamination: An overview. *Ambio (Royal Swedish Academy of sciences).* 23: 187-191.

211. López-Sebastián A, González de Bulnes A, Santiago Moreno J, Gómez Brunet A, Townsend EC, Inskoop EK. 1997. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. *Anim Reprod Sci.* 48: 279-291.
212. Louis GM, Weiner JM, Whitcomb BW, Sperrazza R, Schisterman EF, Lobdell DT, Crickard K, Greizerstein H, Kostyniak PJ. 2005. Environmental PCB exposure and risk of endometriosis. *Hum Reprod.* 20: 279-285.
213. Lovekamp TN, Davis BJ. 2001. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 172: 217-224.
214. Lovekamp-Swan T, Davis B. 2003. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environmental Health Perspectives.* 111: 139-145.
215. Lovekamp-Swan T, Jetten AM, Davis BJ. 2003. Dual activation of PPAR α and PPAR γ by mono-(2-ethylhexyl)phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 201: 133-141.
216. Ma M, Kondo T, Ban S, Umemura T, Kurahashi N, Takeda M, Kishi R. 2006. Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl)phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. *Toxicol Sci.* 93: 164-171.
217. Magnusson U. 2005. Can farm animals help to study endocrine disruption? *Domest Anim Endocrinol.* 29:430-435.
218. Malik S, Kenny M, Ahmad S. 1993. A convenient method to measure di-(2-ethylhexyl) phthalate from the serum of hemodialysis patients. *Toxicol Environ Chem.* 37: 133-137.
219. Maloney EK, Waxman DJ. 1999. trans-Activation of PPAR α and PPAR γ by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 161: 209-218.
220. Mantovani A, Stazi AV, Macri C, Maranghi F, Ricciardi C. 1999. Problems in testing and risk assesment of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental toxicology. *Chemosphere.* 39: 1293-1300.

221. Markey CM, Coombs MA, Sonnenschein C, Soto AM. 2003. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the development plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev.* 5: 67-75.
222. Markey CM, Luque EH, Munoz De Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. 2001. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod.* 65: 1215-23.
223. Martin GB, Price CA, Thiery J.C, Webb R. 1988. Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J Reprod Fertil.* 82: 319-328.
224. Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M. 2008. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regul Toxicol Pharmacol.* 50: 37-49.
225. Mayani A, Barel S, Soback S, Almagor M. 1997. Dioxin concentrations in women with endometriosis. *Hum reprod.* 12: 373-375.
226. McCracken J, Custer E, Lamsa J. 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev.* 79:263-304.
227. McNeilly AS, Jonassen JA, Fraser HM. 1986. Suppression of follicular development after chronic LHRH immunoneutralization in the ewe. *J Reprod Fertil.* 76: 481-90.
228. McNeilly AS, Picton HM, Campbell BK, Baird DT. 1991. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J Reprod Fertil Suppl.* 43: 177-186.
229. Meidan R, Girsh E, Blum O, Aberdam E. 1990. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. *Biol Reprod.* 43: 913-921.
230. Meidan R., Levy T, Kisliouk T, Podlovny L, Rusiansky M, Klipper E. 2005. The yin and yang of corpus luteum derived endothelial cells: Balancing life and death. *Domestic Animal endocrinology.* 29: 318-328.
231. Milvae RA, Hinckley ST, Carlson JC. 1996. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology.* 45: 1327-1349.

232. Minervini F, Dell'Alquila ME, Maritato F, Minoia P, Visconti A. 2001. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicol in vitro*. 15: 489-495.
233. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Michels KB, Hunter DJ. 2004. In utero exposures and the incidence of endometriosis. *Fertil. Steril*. 82: 1501-1508.
234. Mlynarčíkova A, Nagyova E, Fickova M, Scsukova S. 2009. Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte-cumulus complexes. *Toxicol in Vitro*. 23: 371-377.
235. Moore MR, 1997. Oncogenicity study in mice with Di (2-ethylhexyl)phthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analyses. Corning Hazleton Incorporated (CHV), 9200 Leesburg Pike, Vienna, Virginia 22182-1699. Laboratory Study Identification: CHV 663-135; Sponsor: Eastman Chemical Company, First America Center, P.O. Box 1994 Kingsport, Tennessee 37662-5394
236. Moore MR. 1996. Oncogenicity study in rats with Di (2-ethylhexyl)phthalate including ancillary hepatocellular proliferation and biochemical analyses. Corning Hazleton Incorporated (CHV), 9200 Leesburg Pike, Vienna, Virginia 22182-1699. Laboratory Study Identification: CHV 663-134; Sponsor: Eastman Chemical Company, First America Center, P.O. Box 1994 Kingsport, Tennessee 37662-5394
237. Mortensen GK, Main KM, Andersson A-M, Leffers H, Skakkebaek NE. 2005. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal Bioanal Chem* 382: 1084-1092.
238. Mossner S, Ballschmiter K. 1997. Marine mammals as global pollution indicators for organochlorines. *Chemosphere*. 34: 1285-1296.

239. Munoz-de-Toro M, Markey CM, Wadia PR, Luque EH, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM . 2005. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*. 146: 4138–4147.
240. Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM. 2007. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23: 383–390.
241. Mylchreest E, Foster PMD. 1998. Antiandrogenic effects of di(n-butyl) phthalate on male reproductive development: a nonreceptor-mediated mechanism. *CIIT Activities* 18: 1-8.
242. Nagao T, Yoshimura S, Saito Y, Nakagomi M, Usumi K, Ono H. 2001. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod Toxicol*. 15: 399–411.
243. Nässberger L, Arbin A, Ostelius J. 1987. Exposure of patients to phthalates from polyvinyl chloride tubes and bags during dialysis. *Nephron*. 45: 286-290.
244. Nesje M, Flaoyen A, Moe L. 1997. Estimation of glomerular filtration rate in normal sheep by the disappearance of iohexol from serum. *Vet Res Commun*. 21: 29-35.
245. Neubert D. 1997. Vulnerability of the endocrine system to xenobiotic influence. *Regulatory Toxicol Pharmacol*. 26: 9-29.
246. Newbold RR, Moore AB, Dixon D. 2002. Characterization of uterine leiomyomas in CD-1 mice following developmental exposure to diethylstilbestrol (DES). *Toxicol Pathol*. 30: 611–616.
247. Nikaido Y, Yoshizawa K, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Uehara N. 2004. Effects of maternal xenostrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol*. 18: 803-811.
248. Niswender G, Juengel J, Mcguirre W, Belfiore C, Wiltbank M. 1994. Luteal function: the estrous cycle end early pregnancy. *Biology of Reproduction*. 50: 239-247.
249. Niswender G. 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*. 123: 333-339.

250. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 8: 1-29.
251. Niswender GD, Nett TM. 1994. Corpus luteum and its control in intraprimate species. In: *Physiology of Reproduction, Volume I*, E. Knobil and J.D. Neill (Eds.). Raven Press, Ltd, New York. 781-816.
252. Niswender GD, Schwall R, Fitz T, Farin CE, Sawyer HR. 1985. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. *Recent Prog Horm Res.* 41: 101-142.
253. NTIS (National Technical Information Service). 1984. Teratologic evaluation of diethylhexyl phthalate (CAS No. 117-81-7) in CD-1 mice. PB85-105674, 06-20-84.
254. NTP (National Toxicology Program). 1982. Carcinogenesis bioassay of di(2-ethylhexyl) phthalate in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study). NTP Technical Report No. 217: 01-82.
255. Oishi S, Hiraga L. 1982. Distribution and elimination of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and mono-2-ethylhexyl phthalate after a single oral administration of DEHP in rats. *Arch Toxicol.* 51: 149-155.
256. Omori Y. 1976. Recent progress in safety evaluation studies on plasticizers and plastics and their controlled uses in Japan. *Environ Health Perspect.* 17: 203-209.
257. Oussaid B, Mariana JC, Poulin N, Fontaine J, Lonergan P, Beckers JF. 1999. Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil.* 117: 71-77.
258. Padmanabhan V, McNeilly AS. 2001. Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction.* 121: 21-30.
259. Palmer CNA, Hsu M-H, Griffin KJ, Raucy JL and Johnson EF. 1998. Peroxisome Proliferator Activated Receptor- α Expression in Human Liver. *Mol Pharmacol.* 53: 14-22.

260. Palmer JR, Hatch EE, Rao RS, Kaufman RH, Herbst AL, Noller KL, Titus-Ernstoff L, Hoover R N. 2001. Infertility among women exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Am J Epidemiol.* 154: 316-321.
261. Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, Troisi R, Titus-Ernstoff L, Strohsnitter W, Kaufman R, Herbst AL, Noller KL, Hyer M, Hoover RN. 2006. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15: 1509-1514.
262. Parmar D, Srivastava SP, Srivastava SP, Seth PK. 1985. Hepatic mixed function oxidases and cytochrome P-450 contents in rat pups exposed to di-(2-ethylhexyl) phthalate through mother's milk. *Drug Metabol Dispos.* 13: 368-370.
263. Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ. 1993. Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res Vet Sci.* 55, 311–316.
264. Payne A, Hales D. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathways from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine reviews.* 25: 947-970.
265. Peck CC, Albro PW. 1982. Toxic potential of the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate in the context of its disposition and metabolism in primates and man. *Environ Health Perspect.* 45: 11-17.
266. Peters JM, Cattley RC, Conzalez FJ. 1997. Role of PPAR α in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis.* 11: 2029-2033.
267. Petersen JH, Breindahl T. 2000. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit Contam.* 17: 133-141.
268. Písa J, Cibulka J, Ptáček M. 1990. Effect of subcutaneous application of a single cadmium dose on oocyte maturation in vitro. *Physiol Bohemoslov.* 39: 185-190.
269. Pollack GM, Buchanan JF, Slaughter RL, Kohli RK, Shen DD. 1985b. Circulating concentrations of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its de-esterified phthalic acid products following plasticizer exposure in patients receiving hemodialysis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 79: 257-267.

270. Pollack GM, Li RCK, Ermer JC, Shen DD. 1985a. Effects of route of administration and repetitive dosing on the disposition kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate and its mono-de-esterified metabolite in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 79: 246-256.
271. Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BB, Chu I. 1997. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol.* 35: 225-239
272. Quintela M, Barreiro R, Ruiz J M. 2002. Dumpton Syndrome reduces tributyltin (TBT) sterilising effect on *Nucella lapillus* (L.) by limiting the development of imposed vas deferens. *Marine Environmental Research.* 54:657-660.
273. Rabiee AR, Macmillan KL, Schwarzenberger F, Wright PJ. 2002: Effects of level of feeding and progesterone dose on plasma and faecal progesterone in ovariectomised cows. *Anim Reprod Sci.* 73: 185-195.
274. Rao CV. 2001. Multiple novel roles of luteinizing hormone. *Fertil Steril.* 76: 1097-1100.
275. Ravindra JP, Rawlings NC, Evans AC, Adams GP. 1994. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* 101: 501-509.
276. Reddy BS, Rozati R, Reddy S, Kodampur S, Reddy R. 2006. High plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and phthalate esters in women with endometriosis: a prospective case control study. *Fertil Steril.* 85: 775-779.
277. Redmer DA, Reynolds LP. 1996. Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod.* 1: 182-192.
278. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Killilea SD, Redmer DA. 1994. Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog growth factor research.* 5: 159-175.
279. Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. 1992. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB Journal.* 6: 886-892.
280. Rhind SM, Kyle CE, Telfer G, Duff EI, Smith A. 2005. Alkyl phenols and diethylhexyl phthalate in tissues of sheep grazing pastures fertilized with sewage sludge or inorganic fertilizer. *Environmental Health Persp.* 113: 447-453.

281. Rhing SM. 2005. Are endocrine disrupting compounds a threat to farm animal health, welfare and productivity?. *Reprod Dom Anim.* 40: 282-290.
282. Rhodes C, Elcombe CR, Batten PL, Bratt H, Jackson SJ, Pratt IS, Orton TC. 1983. The disposition of ¹⁴C-di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) in the marmoset. *Dev Sci Pract Toxicol.* 11: 579-581.
283. Rhodes C, Orton TC, Pratt IS, Batten PL, Bratt H, Jackson SJ and Elcombe CR. 1986. Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man. *Environ Health Perspect.* 65: 299-308.
284. Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE. 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect.* 113:716-720.
285. Rico AG. 1983. Metabolism of endogenous and exogenous anabolic agents in cattle. *J Anim Sci.* 57: 226-232.
286. Riecke K, Stahlmann R. 2000. Test systems to identify reproductive toxicants. *Andrologia.* 32: 209-218.
287. Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL. 1993. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol.* 21: 433-441.
288. Robinson JE, Birch RA, Grindrod JAE, Taylor JA, Unsworth WP. 2003. Sexual differentiated regulation of GnRH release by gonadal steroid hormones in sheep. *Reprod Suppl.* 61: 299-310.
289. Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. 2006. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A affects. *Endocrinology.* 147: 3681-3691.
290. Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect.* 109: 675-680.

291. Rubin RJ, Schiffer CA. 1976. Fate in humans of the plasticizer, di-2-ethylhexyl phthalate, arising from transfusion of platelets stored in vinyl plastic bags. *Transfusion*. 16: 330-335.
292. Saumande J. 1991. La folliculogénèse chez les ruminants. *Rev Méd Vet*. 167: 205-218.
293. Schams D, Berisha B. 2004. Regulation of corpus luteum function in Cattle-an Overview. *Reprod Dom Anim*. 39: 241-251.
294. Schams D, Berisha B. 2002. Angiogenic factors (VEGF, FGF and IGF) in the bovine corpus luteum. *J Reprod Development*. 48: 233-242.
295. Schilling K, Gemhardt C, Hellwig J. 2001. Di-2-ethylhexyl phthalate - Two-generation reproduction toxicity study in Wistar rats. Continuous dietary administration. *Experimental Toxicology and Ecology*, BASF Aktiengesellschaft, D-67056 Ludwigshafen, FRG. Laboratory project identification 70R0491/97139. 1183 pages. (referenced as BASF 70R0491/97139 in the IUCLID file)
296. Schmid P, Schlatter C. 1985. Secretion and metabolism of di-(2-ethylhexyl) phthalate in man. *Xenobiotica*, 15: 251-256.
297. Schraper S, Potter BE. 2004. Diethylstilbestrol exposure. *Am Fam Physician*. 69:2395-2400 (Review).
298. SCHRICK FN, Surface RA, Pritchard JY, Dailey RA, Townsend EC, Inskoop EK. 1993. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol Reprod*. 49: 1133-1140.
299. Schumaker RC. 1986. PKCALC: a BASIC interactive computer program for statistical and pharmacokinetic análisis of data. *Drug Metabolism. Reviews* 17: 331-348.
300. Sekiguchi S, Ito S, Honma T. 2003. Experimental model to study reproductive toxicity of chemicals using induced ovulation in immature F344 rats. *Ind Health*. 41, 287-290.
301. Sekiguchi S, Ito S, Suda M, Honma T. 2006. Involvement of thyroxine in ovarian toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Ind Health*. 44: 274-279.

302. Selevan SG, Rice DC, Hogan KA, Euling SY, Pfahles-Hutchens A, Bethel J. 2003. Blood lead concentration and delayed puberty in girls. *N Engl J Med.* 348: 1527-1536.
303. Seth PK. 1982. Hepatic Effects of Phthalate Esters. *Environ Health Perspect.* 45: 27-34.
304. Sharpe RM, Walker M, Millar MR, Atanassova, Morris K, McKinnell C, Saunders PTK, Fraser HM. 2000. Effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist administration on Sertoli cell number and testicular development in the marmoset: comparison with the rat. *Biol of Reprod.* 62: 1685-1693.
305. Shaw GRCDW. 1986. PCBs in the Environment, Waid JS., ed, pp.121-133, CRC Press, Boca ratón
306. Shell .1982. Bis(2-ethylhexyl) phthalate: Toxicokinetics of 14-day subacute oral administration to rats and marmosets. TSCATS: OTS 0539135, Doc. I. D.: 88-920002040, 05-21-82, Shell Oil Co.
307. Short P, Colborn T. 1999. Pesticide use in the U.S. and policy implications: a focus on herbicides. *Toxicol Ind Health.* 15: 240-25
308. Short RD, Robinson EC, Lington AW, Chin AE. 1987. Metabolic and peroxisome proliferation studies with di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats and monkeys. *Toxicol Ind Health.* 3: 185-195.
309. Silva MJ, Reidy JA, Herbert AR, Preau JL, Needham LL, Calafat AM. 2004. Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. *Bull Environ Contam Toxicol.* 72: 1226-1231.
310. Silva MJ, Reidy JA, Samandar E, Herbert AR, Needham LL, Calafat AM. 2005. Detection of phthalate metabolites in human saliva. *Arch Toxicol.* 79: 476-652.
311. Singh AR, Lawrence WH, Autian J. 1975. Maternal-foetal transfer of ¹⁴C-di-(2-ethylhexyl) phthalate and ¹⁴Cdiethyl phthalate in rats. *J Pharm Sci.* 64: 1347-1350.
312. Sjöberg P, Bondesson U, Hammarlund M. 1985d. Non-linearities in the pharmacokinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate and metabolites in male rats. *Arch Toxicol.* 58: 72-77.

313. Sjöberg P, Bondesson U, Kjellen L, Lindquist N-G, Mentin G, Plöen L. 1985c. Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacol Toxicol.* 56: 30-37.
314. Sjöberg P, Bondesson U, Sedin G, Gustafsson J. 1985a. Disposition of di- and mono-(2ethylhexyl)phthalate in newborn infants subjected to exchange transfusions. *Eu J Clin Invest.* 15: 430-436.
315. Sjöberg P, Lindqvist NG, Plöen L. 1986b. Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* 65, 237-242
316. Sjöberg PO, Bondesson UG, Sedin EG, Gustafsson JP. 1985b. Exposure of newborn infants to plasticizers. Plasma levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate during exchange transfusion. *Transfusion.* 25: 424-428.
317. Smith MF, McIntush EW, Smith GW. 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci.* 72: 1857–1872.
318. Sonnenschein C, Soto AM. 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 65:143-50. Review
319. Srivastava S, Awasthi VK, Srivastava SP, Seth PK. 1989. Biochemical alterations in rat foetal liver following inutero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Indian J Exp. Biol.* 27: 885-888.
320. Stevens JT, Breckenridge CB, Wetzel LT, Gillis JH, Luempert LG 3rd, Eldridge JC. 1994. Hypothesis for mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats exposed to certain triazine herbicides. *J Toxicol Environ Health.* 43:139-153.
321. Stocco C, Telleira C, Gibori G. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine reviews.* 28: 117-149.
322. Sumpter JP, Jobling S. 1995. Vitellogenin as a biomarker of exposure to oestrogens. *Environmental Health Perspectives.* 103(S7): 173-178.
323. Susiarjo M, Hassold TJ, Freeman E, Hunt PA. 2007. Bisfenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet.* 3:e5.
324. Suzuki A, Sugihara A, Uchida K, Sato T, Ohta Y, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T. 2002. Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and

- diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol.* 16: 107-116.
325. Svechnikova I, Svechnikov K, Söder O. 2007. The influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis by the ovarian granulosa cells of immature female rats. *J Endocrinol.* 194: 603-609.
326. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, MaoCS, Redmon JB, Terman CL, Sullivan S, Teague JL. 2005. And the study for future families Research team. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect.* 113: 1056-1061.
327. Swan SH. 2008. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res.* 108: 177-184.
328. Symonds ME, Budge H, Stephenson T. 2003. Physiological and nutritional aspects of the placenta. In: Morgan JB & Dickerson JWT, ed. *Nutritional in early life: concepts and practice.* Oxford: John Wiley & Sons, Ltd. 91.
329. Tachibana T, Wakimoto Y, Nakamura N, Phichitraslip T, Wakitani S, Kusakabe K, Hondo E, Kiso Y. 2007. Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice. *J Reprod Dev.* 53: 509-514.
330. Takatori S, Kitagawa Y, Kitagawa M, Nakazawa H, Hori S. 2004. Determination of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 804: 397-401.
331. Takai R, Hayashi S, Kiyokawa J, Iwata Y, Matsuo S, Suzuki M, Mizoguchi K, Chiba S, Deki T. 2009. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 10) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in female rats. *J Toxicol Sci.* 34:SP111-119
332. Takehisa H, Naoko E, Masahiko S, Katsuhide T, Moriyuki O, Keizoh S, Mutsuko T, Kenji K, Shin'ichiro N, Toshio O. 2005. Release behaviour of diethylhexyl phthalate from the polyvinyl-chloride tubing used for intravenous administration and the plasticized PVC membrane. *Int J Pharm.* 297: 30-37.

333. Tandon R, Chowdhary SR, Seth PK and Srivastava SP. 1990. Altered development of testis of rat exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) during lactation. *J Environ Biol.* 11: 345-354.
334. Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M. 2001. Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am J Ind Med.* 39: 100-111.
335. Torner H, Brusoww KP, Alm H, Ratky J, Pohland R, Tuchscherer A, Kanitz W. 2004. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology.* 61: 1675-1689
336. Tsonis CG, McNeilly AS, Baird DT. 1988. Inhibin secretion by the sheep ovary during the luteal and follicular phases of the oestrous cycle and following stimulation with FSH. *J Endocrinol.* 117:283-291.
337. Tugwood JD, Aldridge TC, Lambe KG, MacDonald N, Woodyatt NJ. 1996. Peroxisome proliferator activated receptors: Structures and function. *Ann NY Acad Sci.* 804: 252-265.
338. Tyl RW, Price CJ, Marr MC, Kimmel CA. 1988. Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl) phthalate in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fundam Appl Toxicol.* 10: 395-412.
339. Uilenbroek JT, Woutersen PJ, van der Schoot P. 1980. Atresia of preovulatory follicles: gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biol Reprod.* 23: 219-229.
340. Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology.* 51: 1351-1361.
341. Waddell WJ, Marlowe C, Miripol JE, Garvin PJ. 1977. The distribution in mice of intravenously administered plasma solutions of (14C)di(2-ethylhexyl) phthalate determined by whole-body autoradiography. *Toxicol Appl Pharmacol.* 39: 339-353.

342. Ward JM, Peters JM, Perella CM, Gonzalez FJ. 1998. Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor α -null mice. *Toxicol Pathol.* 26: 240-246.
343. Watanabe T, Shimada T, Endo A. 1979. Mutagenic effects of cadmium on mammalian oocyte chromosomes. *Mutat Res.* 67: 349-356.
344. Wathes DC, Lamming GE. 1995. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl.* 49: 53-67. Review.
345. Webb R, Engeland BG. 1982. Identification of the ovulatory follicle in the ewe: associated changes in the follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinol.* 110: 873-881.
346. Wester RC, Melendres J, Sedrik L, Maibach H, Riviere JE. 1998. Percutaneous Absorption of Salicylic Acid, Theophylline, 2,4-Dimethylamine, Diethyl Hexyl Phthalic Acid, and p-Aminobenzoic Acid in the Isolated Perfused Porcine Skin Flap Compared to Man in Vivo. *Toxicol Appl Pharmacol.* 151: 159-165.
347. White LM, Keisler DH, Dailey RA, Inskeep EK. 1987. Characterization of ovine follicles destined to form subfunctional corpora lutea. *J Anim Sci.* 65:1595-1601.
348. White R, Joblin S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. 1980. Absorption and metabolism of three phthalate diesters by the rat small intestine. *Food Cosmet Toxicol.* 18: 383-386.
349. Widdowson EM. 1950. Chemical composition of newly born animals. *Nature.* 166: 626-628.
350. Wiltbank MC, Diskin MG, Niswender GD. 1991. Differential actions of second messenger systems in the corpus luteum. *J Reprod Fertil Suppl.* 43: 65-75.
351. Wiltbank MC. 1994. Cell types and hormonal mechanism associated with mid-cycle corpus luteum function. *J Animal Science.* 72: 1873-1883. Review.
352. Windham GC, Lee D, Mitchell P, Anderson M, Petreas M, Lasley B. 2005. Exposure to organochlorine compounds and effects on ovarian function. *Epidemiology.* 16: 182-190.

353. Wittassek M, Angerer J. 2008. Phthalates: metabolism and exposure. *International Journal of Andrology*. 31: 131-138.
354. Wittassek M, Wiesmüller GA, Koch HM, Eckard R, Dobler L, Müller J, Angerer J, Schlüter C. 2007. Internal phthalate exposure over the last two decades – A retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health*. 210: 319-333.
355. Wolfe GW, Layton KA. 2003. Multigeneration reproduction toxicity study in rats (unaudited draft): Diethylhexylphthalate: Multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. TherImmune Research Corporation (Gaithersburg, Maryland), TRC Study No 7244-200. (<http://ntp.niehs.nih.gov/go/15182>).
356. Woodyatt NJ, Lambe KG, Myers KA, Tugwood JD, Robert RA. 1999. The peroxisome proliferator (PP) response element upstream of the human acyl CoA oxidase gene is inactive among a sample human population: significance for species differences in response to PPs. *Carcinogenesis*. 20: 369-372.
357. Wu T, Buck GM, Mendola P. 2003. Blood lead levels and sexual maturation in U.S. girls: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Environmental Health Perspectives*. 111: 737-741.
358. Xu Y, Agrawal S, Cook TJ, Knipp GT. 2008. Maternal di-(2-ethylhexyl)-phthalate exposure influences essential fatty acid homeostasis in rat placenta. *Placenta*. 29: 962-969.
359. Yang JZ, Agarwal SK, Foster WG. 2000. Subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates the pathophysiology of endometriosis in the cynomolgus monkey. *Toxicol Sci*. 56: 374-381
360. Zacharewski T. 1998. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in-vivo and in-vitro assays. *Environ Health Perspect*. 106: 577-582.
361. Zeleznik AJ, Hillier SG. 1984. The role of gonadotropins in the selection of the preovulatory follicle. *Clin Obstet Gynecol*. 27: 927-940.

ANEXO I. METODOLOGÍA

ÍNDICE METODOLOGÍA

A.I.1.	Determinación de los niveles plasmáticos de DEHP por cromatografía líquida de alta eficacia	185
A.I.2.	Sincronización de celos y ovulaciones	186
A.I.3.	Valoración morfológica de las estructuras ováricas mediante ultrasonografía	186
A.I.4.	Valoración de la secreción endocrina de los folículos preovulatorios y cuerpos lúteos	187
A.I.5.	Valoración de la secreción de LH	187
A.I.6.	Valoraciones histológicas de cuerpos lúteos e hígados	188

A.I.1. Determinación de los niveles plasmáticos de DEHP por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

En este análisis, el DEHP, el acetonitrilo y el tetrahidrofurano fueron de calidad CLAE y procedentes de Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). El DEHP standard fue preparado por disolución en acetonitrilo y almacenado a 4 °C.

Preparación de la muestra

Para minimizar una posible contaminación con ftalatos de las muestras, durante todo el manejo y procesado de las mismas, se utilizaron material de vidrio prelavado con solventes orgánicos y guantes de plástico de nitrilo (libres de ftalatos).

La muestra de plasma (1 ml) era depositada en un tubo de cristal y mezclada con 1 ml de solución de NaOH (1M), 500 µl de acetonitrilo y 2 ml de n-hexano. La mezcla era vigorosamente mezclada en el agitador durante 2 min y centrifugada a 2500 x g durante 5 min. La fase superior era transferida a otro tubo de cristal y la fase inferior era extraída nuevamente con 2 ml de n-hexano. La fase orgánica superior era añadida a la primera y evaporada bajo atmósfera de nitrógeno a 40 °C. Los extractos desecados eran reconstituidos en 250 µl de acetonitrilo, mezclados en el agitador durante 20 segundos y transferidos a los viales del autoinyector para el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE).

Condiciones cromatográficas

La medida de las concentraciones de DEHP en plasma se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia con detección por absorbancia en ultravioleta (CLAE-UV), en base al método descrito por Kambia y col. (2001). El sistema de CLAE (Spectra-physic Series, Thermo Scientific, Essex, Reino Unido) incluía una bomba (P100), un inyector automático (AS1000) y un detector de longitud de onda UV variable (UV100) fijado en 210 nm. Las señales eran registradas con un Spectra physic integrator (DATAJET CH1).

La separación se realizó en una columna Mediterranean sea-C₁₈ (Teknokroma, Barcelona, Spain: 150 mm X 4,6 mm d.i., 5 µm tamaño de la partícula) a 25 °C. La fase móvil estaba constituida por una mezcla de acetonitrilo, tetrahidrofurano y agua (60:25:15 por volumen) y era bombeada con una velocidad de flujo de 1,5 ml/min. La recuperación de DEHP tras los procesos de limpieza y extracción era del 97,3%. El método fue evaluado para linealidad, especificidad y precisión. Las rectas de calibración mostraron un coeficiente de correlación >0.978 y el límite de cuantificación fue 28,4 ng/ml. La variabilidad intra e inter día era < 10%.

A.1.2. Sincronización de celos y ovulaciones

En el Objetivo 4, la sincronización de celos y ovulaciones se realizó mediante la inserción, durante 6 días, de esponjas intravaginales impregnadas con 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA, Chronogest[®], Intervet International, Boxmeer, Holanda) junto con la administración de una dosis intramuscular de 125 µg de cloprostenol (Estrumate[®], Mallinckrodt Vet GmbH, Friesoythe, Alemania) en el momento de la inserción del progestágeno. Una vez retirada la esponja, las detecciones de celos se llevaban a cabo de forma individual, empleando moruecos adultos entrenados, cada 12 horas entre las 12 y las 60 horas tras la retirada del progestágeno.

A.1.3. Valoración morfológica de las estructuras ováricas mediante ultrasonografía

Las ultrasonografías fueron realizadas mediante una sonda transrectal de haz lineal y alta resolución (7,5 MHz) adaptada a un ecógrafo Aloka SSD 500 (Ecotron, Madrid, España) siguiendo el método descrito por Schrick y col., (1993) y validado posteriormente en nuestro laboratorio (Gonzalez-Bulnes y col., 1994). Las observaciones fueron realizadas con la hembra posicionada en decúbito supino sobre una camilla. Para facilitar la transmisión de los ultrasonidos, se utilizó un gel de contacto hidrosoluble. La sonda se introducía paralela a la pared abdominal de la hembra y con el transductor orientado ventralmente. Una vez visualizada la vejiga de la orina, se observaban los cuernos uterinos y, posteriormente eran localizados los ovarios mediante rotación lateral de la sonda. La observación del ovario (Figura A.1.1) incluía la valoración de la presencia y características morfológicas de cuerpos lúteos (Objetivos 3 y 4) y folículos ≥ 2 mm (Objetivo 4).

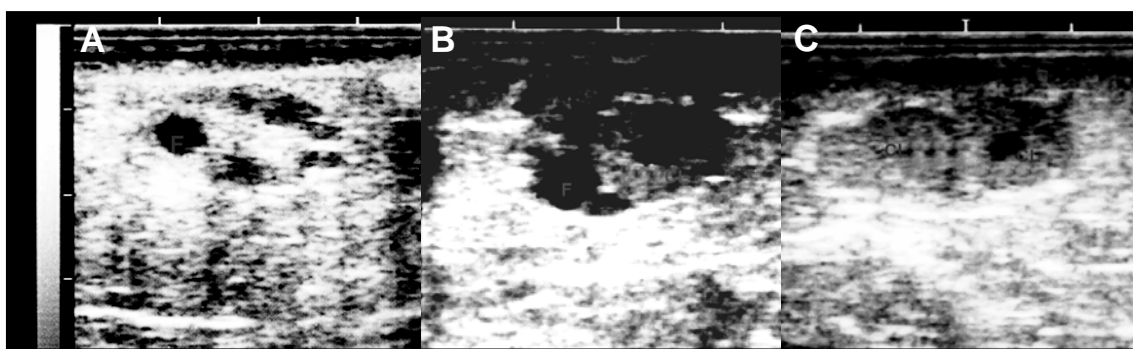


Figura A.1.1. Imágenes ultrasonográficas de ovarios con folículos preovulatorios (A), folículos y cuerpo lúteo (B) y cuerpos lúteos (C).

En cada observación, para el estudio morfométrico de la población folicular y luteal, se realizaba un esquema donde se anotaba la situación topográfica relativa de cada estructura con respecto al resto. Para este seguimiento individual se realizaba la

medición del diámetro folicular y del área del tejido luteal mediante los calibradores de que dispone el ecógrafo; en aquellos cuerpos lúteos con cavidad, se substría el área de ésta del total del área del cuerpo lúteo. En el caso de los folículos, este seguimiento permitió definir el crecimiento del folículo preovulatorio y los cambios en la población folicular de acuerdo a las siguientes variables: número total de folículos ≥ 2 mm, número de folículos pequeños (2-3 mm de diámetro), número de folículos medianos (4-5 mm de diámetro) y número de folículos grandes (≥ 6 mm de diámetro).

A.I.4. Valoración de la secreción endocrina de los folículos preovulatorios y de los cuerpos lúteos

Las tomas de sangre para la determinación de las concentraciones plasmáticas de estradiol (Objetivo 4) y progesterona (Objetivos 3 y 4) fueron llevadas a cabo por venopunción yugular y recogida de muestra en tubos heparinizados al vacío (Vacutainer® Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, Francia). Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y una vez recuperada la fracción plasmática, ésta fue conservada a -20 °C hasta su análisis.

La concentración plasmática de estradiol fue valorada por duplicado mediante kits de enzimoimmunoensayo (Estradiol sensitive ELISA, Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel-Wellsee, Alemania). La sensibilidad del ensayo fue de 1,4 pg/ml y los coeficientes de variación inter- e intraensayo fueron de 5,7 y 6,8 %, respectivamente.

La concentración plasmática de progesterona fue también valorada por duplicado mediante kits de enzimoimmunoensayo (Progesterone ELISA, Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel-Wellsee, Alemania). La sensibilidad del ensayo fue de 0,04 ng/ml y los coeficientes de variación inter- e intraensayo fueron de 5,4 y 9,9 %, respectivamente.

A.I.5. Valoración de la secreción de LH

En el Objetivo 4, en el día 5 del ciclo inducido por la administración de progestágenos, se llevó a cabo un muestreo sanguíneo seriado, con la metodología descrita en el apartado anterior, para la determinación de las concentraciones basales y la secreción pulsátil de LH; estas muestras se tomaron a intervalos de 15 minutos durante 4 horas.

Las concentraciones de LH fueron determinados mediante kits de enzimoimmunoensayo (LH Detect®, INRA, Tours, Francia), cuya sensibilidad fue de 0,01 ng/mL. Los coeficientes de variación inter- e intraensayo fueron de 3,4 % y 9,6 %, respectivamente.

A.I.6. Valoraciones histológicas de cuerpos lúteos e hígados

Una vez obtenidos los ovarios (Objetivo 4), se sumergían en una solución de PBS (phosphate buffered saline) y se trasladaban al laboratorio. Inmediatamente, los cuerpos lúteos presentes en el ovario eran diseccionados de forma mecánica con un par de pinzas finas y fijados en solución de Bouin. Asimismo, se obtuvieron muestras de hígado que se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 4 horas. Posteriormente, todas las muestras fueron incluidas en parafina y seccionadas en láminas de 4 μm . Estas láminas se tiñeron con hematoxilina-eosina y las características tisulares se valoraron mediante microscopía (Olympus DX50, Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA).

