

DISRUPTORES ENDOCRINOS EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

ENDOCRINE DISRUPTERS IN REPRODUCTIVE BIOLOGY

Nicolás Olea ¹, Cristóbal Avivar². ¹Laboratorio de Investigaciones Médicas

Hospital Clínico. Universidad de Granada. 18071 Granada. email: nolea@ugr.es

² Area Integrada de Biotecnología. Hospital de Poniente. 04700 El Ejido Almería- email: Cristóbal.avivar.sspa@juntadeandalucia.es

Agradecimiento: Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda recibida de los Proyectos FIS 02/1314 y Unión Europea QLRT-1999-01422 y QLK4-CT-2002-00603

RESUMEN

Las observaciones experimentales en el laboratorio, los estudios en distintas especies animales y la información epidemiológica sugieren que algunos compuestos químicos identificados hoy día como disruptores endocrinos pueden subyacer en la etiología de distintos desórdenes y enfermedades de presentación creciente en humanos. La hipótesis patogénica sugiere que algunos de los contaminantes ambientales que se comportan como hormonas, alteran la homeostasis hormonal y originan un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos y hormonas tiroideas: i) a través de mecanismos de acción diversos; ii) actuando en periodos críticos del desarrollo; iii) con una expresión de efecto que a veces es tardía o incluso transgeneracional; iv) presentando un umbral de concentración inferior al reconocido como límite para otros aspectos toxicológicos y v) actuando de forma combinada para originar un efecto sinérgico, antagónico o aditivo. El síndrome de disgenesia testicular (TDS), asociado a factores ambientales que actúan sobre el desarrollo del tracto reproductivo masculino en la etapa fetal, se presenta como uno de los paradigmas de disrupción endocrina en la especie humana.

PALABRAS CLAVE: Disruptores endocrinos, síndrome de disgenesia testicular, exposición medioambiental

SUMMARY

Experimental observations, environmental studies of animals, and epidemiological research in humans suggest that certain chemical compounds now known as endocrine disrupters may play a role in the etiology of some diseases of increasing incidence in humans. The working hypothesis proposes that hormone-mimicking chemicals disrupt endocrine homeostasis of estrogens, androgens, and thyroid hormones, acting: i) through different mechanisms of action; ii) at critical stages of development; iii) at concentrations lower than expected; iv) in a synergistic, antagonistic, or combined way; and v) with manifestation late in the life of exposed individuals or in their descendents. The so-called testicular dysgenesis syndrome (TDS), associated with environmental factors and involving malformations and dysfunctions of the male genital tract, is presented as a paradigm of endocrine disruption in humans

KEY WORDS: Endocrine disrupters, testicular dysgenesis syndrome, environmental exposure

INTRODUCCIÓN

En los últimos diez años han ido publicándose nuevos datos en la literatura científica especializada que relacionan la exposición a ciertos compuestos químicos, introducidos en el medio ambiente por la actividad humana, con la aparición de nuevos síndromes y el desarrollo de enfermedades específicas de causa no bien conocida. La preocupación por la incidencia creciente de este tipo de alteraciones ha atraído la atención de clínicos e investigadores que tratan de formular, con mayor o menor éxito, nuevas aproximaciones conceptuales en la etiología de la enfermedad (Ashford and Miller, 1998).

Se estima en más de 80.000 las sustancias químicas producidas por el hombre, desde el inicio de la revolución industrial, que no tienen parangón en la naturaleza. Fue a partir de los años cuarenta cuando comenzó la producción masiva y la liberación medioambiental de muchos de estos compuestos químicos, de tal manera que una media de 2.000 sustancias químicas nuevas se incorporan anualmente al censo de sustancias derivadas de la actividad humana. El hombre y su entorno resultan, pues, fácilmente expuestos a estos compuestos tanto desde el momento de su fabricación como a través de los procesos de distribución, uso y degradación final. La exposición ocurre porque estas sustancias químicas forman parte de la forma de vida actual y tiene lugar ya sea de forma conocida y programada o bien como consecuencia de un proceso no intencionado, accidental o simplemente inadvertido (SACO 100EN).

Las alteraciones sobre la salud animal que han sido detectadas tras la exposición en distintas especies de animales (peces, reptiles, pájaros, mamíferos) e incluso en el hombre, incluyen de forma sorprendente enfermedades hormono-dependientes entre las que se encuentran: disfunciones tiroideas, alteraciones en el crecimiento, aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino, disminución de la fertilidad, pérdida en la eficacia del apareamiento, anomalías del comportamiento, alteraciones metabólicas evidentes desde el nacimiento, desmasculinización, feminización y alteraciones del sistema inmune, e incluso incremento en la incidencia de diferentes tipos de cáncer (Colborn *et al.*, 1993).

La hipótesis patogénica subyacente explica que algunas de estas sustancias químicas se comportan como hormonas, alterando la homeostasis normal del sistema endocrino, o lo que es lo mismo, produciendo un desequilibrio en el balance de estrógenos, andrógenos, progestágenos, u hormonas tiroideas, a través de mecanismos de acción diversos (Miller and Sharpe, 1998). Aunque cualquier sistema hormonal es susceptible de ser dañado, lo cierto es que los primeros compuestos exógenos o xenobióticos identificados se comportan como estrógenos o andrógenos, es decir, interfiriendo con las hormonas sexuales, ya sea imitando o bloqueando su acción. De ahí que la información existente relativa a los xenoestrógenos o xenoandrógenos sea cualitativa y cuantitativamente más importante que para otros xenobióticos hormonales (Olea, 1996).

La idea de que estas sustancias con actividad hormonal puedan tener un efecto adverso sobre la salud humana y animal no es un tema nuevo. A comienzos de los años 60, Raquel Carson (Carson, 1962) advirtió que ciertos productos químicos de síntesis utilizados para el control de las plagas agrícolas se habían difundido de tal manera por todo el planeta que estaba afectando de manera universal e inadvertida al equilibrio entre las especies. Carson no sólo describió el modo en el que la naturaleza se estaba impregnando con estos productos sino que, además, puso en evidencia como estas sustancias se iban acumulando en los organismos vivos, advirtiendo que los efectos no se manifestaban necesariamente de forma inmediata y/o drástica sino que permanecían latentes durante años, expresándose de forma tardía incluso en generaciones posteriores.

Las observaciones experimentales, los estudios en distintas especies animales y los datos de laboratorio no hicieron mas que incrementar la preocupación por estos hechos y motivaron la celebración de la conferencia *Estrogens in the Environment* en el Instituto Nacional de Salud y Medio Ambiente americano (NIEHS) (1979), dónde se constató la presencia medioambiental de sustancias que se comportaban como hormonas. Se estableció, así mismo, de una manera sencilla que estos compuestos imitarían a la hormona uniéndose a su receptor, provocando el mismo espectro de efectos biológicos que la hormona natural, o bien antagonizarían el efecto hormonal bloqueando el receptor correspondiente. En ambos casos, el resultado final sería una alteración del sistema hormonal con consecuencias difícilmente predecibles. En 1979 no se tenía todavía mucha información sobre los efectos de estas sustancias sobre la salud humana, por lo que gran parte de las conclusiones eran puramente especulativas. No fue hasta la siguiente conferencia *Estrogens in the Environment II* (NIEHS), celebrada en 1985, cuando se presentaron datos que revelaban el efecto de los xenoestrógenos sobre el desarrollo humano. Se demostró, así mismo, la ubicuidad de estas sustancias y se

presentó información sobre la variabilidad de su potencias como hormonas exógenas, tanto de los agonistas como de los antagonistas hormonales (McLachlan, 1993). En el verano de 1991 se celebró la Conferencia de Wingspread (Wisconsin, USA) donde un grupo de 21 científicos, representando más de una docena de disciplinas, se reunieron para discutir la evidencia existente de cómo distintos compuestos químicos podían estar afectando a la reproducción y al desarrollo de los animales y a la salud humana. En esta conferencia se concluyó que *un gran número de sustancias químicas, sintetizadas por el hombre y liberadas al medio ambiente, así como algunas naturales, tienen efecto sobre el sistema endocrino del hombre y de los animales. Se trata de compuestos persistentes, organohalogenados y bioacumulables que incluyen algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas),..... compuestos de síntesis y algunos metales.* Incluso se acuñó un nombre para este tipo de compuestos químicos, los cuales se conocen desde entonces con el nombre de *disruptores endocrinos* (Colborn and Clement, 1992). En España, este nombre fue aceptado por consenso en la primera Conferencia Nacional de Disruptores Endocrinos celebrada en Granada en 1996, y que de forma ininterrumpida ha actuado en San Sebastián, Barcelona, Lisboa, Madrid y Alicante.

Con posterioridad a la Conferencia de Wingspread, otras reuniones científicas como las celebradas en Weybridge 1996 (UK), de nuevo en Wingspread (1997) y más recientemente en Aronsborg (2001) han servido para sentar las bases conceptuales de la disrupción endocrina, definir la forma de aproximación científica más apropiada y la correcta evaluación de la importancia de los disruptores hormonales en la salud humana y de las especies animales.

Disruptores endocrinos

El término disruptores endocrinos (*Endocrine Disrupting Chemicals / EDCs*) define hoy día a un grupo sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso. Se trata de sustancias exógenas al organismo, naturales o sintéticas, que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción biológica o eliminación de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y regulación del desarrollo (COM 706). En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los tests habituales de toxicidad no habían atribuido efecto importante alguno. Además, muchos de ellos presentan gran estabilidad e inercia para reaccionar químicamente, por lo que reúnen características óptimas para haber sido, y ser empleados, en grandes cantidades y con gran libertad sin protección medio ambiental especial. En otras ocasiones se trata de compuestos bien conocidos por su capacidad para acumularse y persistir en las cadenas tróficas, como es el caso de los conocidos y caracterizados POPs o contaminantes orgánicos persistentes, sobre los que se han establecido medidas de control adecuadas.

Los efectos hormonales de los disruptores endocrinos pueden ser debidos a que: 1) mimetizan los efectos de hormonas endógenas, 2) antagonizan la acción normal de las hormonas, 3) alteran el patrón de síntesis y metabolismo de hormonas naturales, y/o 4) modifican los niveles de los receptores hormonales (Fernández *et al.*, 1998).

Se ha sugerido que los disruptores endocrinos presentan características particulares que los hacen distintos a otros tóxicos medio ambientales y que condicionan cualquier aproximación a la relación de causalidad buscada entre exposición y enfermedad (Colborn *et al.*, 1993), esta forma especial de toxicidad podría deberse a que:

- 1) El momento de la exposición es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y la evolución posterior del efecto. Los efectos son distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal o el adulto. Si actúan durante un periodo crítico, como por ejemplo en los estadios tempranos de la vida, caracterizados por una rápida diferenciación celular y organogénesis, producen lesiones irreversibles.
- 2) Los efectos pueden no aparecer en el momento de la exposición. Las consecuencias se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que en el progenitor expuesto. La exposición embrionaria puede tener consecuencias que no son evidentes hasta la madurez del individuo. El desarrollo anormal no se expresa necesariamente en el nacimiento; sus

efectos pueden permanecer latentes durante años o hacerse patentes en la descendencia en lugar de en los individuos expuestos.

- 3) No existe un umbral de concentración preciso para el desarrollo del efecto toxicológico, o al menos, ese nivel de concentración es muy inferior al reconocido como límite de seguridad para otros aspectos toxicológicos distintos de la disrupción endocrina.
- 4) Es posible la acción combinada de los disruptores que pueden adquirir al actuar conjuntamente un efecto paradójico, ya sea sinérgico, antagónico o simplemente aditivo.

Esta forma especial de acción toxicológica que a veces escapa a las reglas más habituales del proceso de evaluación del riesgo ha dado lugar a muy diversas interpretaciones del problema de la disrupción endocrina (Informe EUR 18345, 1997). Sirva como resumen de la perplejidad desencadenada la reciente declaración del Comité de Expertos de la antigua Dirección General XXIV, hoy Comité Científico de la Toxicidad, Ecotoxicidad y el Medio Ambiente (1999), referente a lo que es, y lo que no es, disrupción endocrina ya que se dice textualmente que *disrupción endocrina no es un objetivo toxicológico per se como pudiera ser cáncer o alergia, es más bien el descriptor de un cambio fisiológico que puede conducir a un efecto adverso para la salud.*

Como se ha dicho anteriormente, una de las acciones hormonales mejor documentada atribuible a los disruptores endocrinos es su capacidad de mimetizar o bloquear el efecto de los estrógenos, es decir, la posibilidad de actuar como un estrógeno o como un antiestrógeno. La potencia estrogénica de estos compuestos es muy variable y abarca desde mimetizadores tan potentes como el mismo estradiol a débiles agonistas que tan sólo tienen actividad parcial y a muy altas concentraciones (Olea, 1996; Olea *et al.*, 1999). Todo esto ha llevado a considerar de forma especial dentro del grupo de los disruptores endocrinos a esta clase de moléculas que se incluyen todas bajo el epígrafe de xenoestrógenos, entendiendo por tales todos aquellos compuestos que manifiestan actividad estrogénica en ensayos *in vitro* e *in vivo* independientemente de su estructura química, procedencia y aplicaciones (Olea *et al.*, 1996).

Síndrome de disgenesia testicular

En 2001, Niels Skakkebaek, Ewa Rajpert-De Meyts y Katherin Main publicaban un artículo en la revista *Human Reproduction* en el que revisaban de forma pormenorizada las pruebas que sugieren que una serie de alteraciones de la salud reproductiva masculina tienen como base patofisiológica común cambios específicos que ocurren durante el desarrollo fetal del testículo. Este conjunto de alteraciones, reconocidas y agrupadas bajo el nombre de síndrome de disgenesia testicular (TDS), están asociadas y posiblemente causadas por factores ambientales en la mayor parte de los casos, y por factores genéticos en algunas situaciones muy particulares. La propuesta de Skakkebaek y sus colaboradores es que durante la etapa fetal de desarrollo del tracto reproductivo variaciones sutiles de los niveles hormonales pueden conducir a disfunción orgánica y, en última instancia, a enfermedad clínica.

En la hipótesis patogénica tanto los factores ambientales, entre los que se incluyen las sustancias químicas contaminantes ambientales con actividad hormonal (disruptores endocrinos), como algunos defectos genéticos, afectan a la funcionalidad de las células de Sertoli o de Leydig (Rajpert-De Meyts *et al.*, 2000). En el primero de los casos, una función celular de Sertoli alterada da lugar a una alteración importante de la diferenciación de las células germinales que en última instancia se manifiesta clínicamente ya sea como pobre calidad seminal o mediante la transformación maligna hacia cáncer testicular. En la otra vía, la disminución de la función de las células de Leydig trae consigo una insuficiencia androgénica que se manifiesta clínicamente como hipospadias y/o criptorquidia. En el origen de estos cuadros está, por tanto, un único proceso, el síndrome de disgenesia testicular como causa de este abanico de enfermedades.

Para añadir más complejidad al enunciado patogénico, se establecen relaciones de conexión entre las dos grandes vías (Sertoli y Leydig) y se propone que la expresión de los síntomas clínicos variará con la severidad del síndrome, de tal manera que algunos individuos

presentarán mas patología que otros, pero siempre dentro del ámbito del cuadro descrito. Mientras que en los casos mas leves tan solo es apreciable un problema en calidad y cantidad de producción espermática y el riesgo de cáncer testicular es mínimo, en los casos más severos junto a las alteraciones a la espermatogénesis, aparecerán alteraciones en el descenso testicular y una mayor probabilidad de cáncer de testículo.

Los datos epidemiológicos recogidos por Skakkebaek y sus colegas parecen indicar que la prevalencia del síndrome descrito es mayor de lo que se suponía, ya que el síndrome en su forma leve podría estar afectando a cerca de un quinto de la población danesa, si se consideran los datos de calidad seminal en ese país (Andersen *et al.*, 2000).

Quizás una de las repercusiones mayores de la nueva hipótesis planteada por el equipo danés radica en el hecho de que los estudios epidemiológicos en calidad espermática, no descenso testicular e hipospadias y cáncer de testículo deberían considerar aquellos aspectos que permitan establecer una asociación de causalidad entre estas patologías y factores medioambientales (García-Rodríguez *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1998). A este respecto, es de capital importancia el papel otorgado a la exposición fetal a sustancias químicas con actividad hormonal ya que tanto los datos observacionales en animales, como la epidemiología humana y los estudios de laboratorio orientan sobre el papel de las hormonas y sus mimetizadores y antagonistas sobre cada una de las enfermedades de interés (Sharpe and Skakkebaek, 1993).

En palabras de Skakkebaek, la hipótesis de causalidad de las hormonas medioambientales o disruptores endocrinos es relevante y plausible y se apoya en observaciones clínicas tan importantes como la experiencia humana con el fármaco dietilestilbestrol (DES) o las alteraciones en hijos de trabajadores profesionalmente expuestos a algunos pesticidas clasificados, hoy día, como xenohormonas (Newbold and McLachlan, 1985). El hecho de que estemos asistiendo a un incremento importante de estas patologías en determinadas áreas geográficas y que estos cambios estén ocurriendo en el curso de unas pocas generaciones orienta sobre la búsqueda de causas ambientales actuando (Toppari *et al.*, 1996), quizás, sobre un fondo de predisposición genética que implicaría alguna forma de susceptibilidad individual (Nef and Parad, 2000).

La experimentación animal ha servido para demostrar que los animales de laboratorio expuestos en útero o perinatalmente a estrógenos exógenos como DES, etinilestradiol o bisfenol-A y anti-andrógenos como flutamida, vinclozolina y DDE (Kelce *et al.*, 1997) desarrollan hipospadias, no descenso testicular y bajo cuenta espermática y, en los casos mas extremos, condiciones intersexuales, tumores de Leydig y teratomas (Newbold and McLachlan, 1985; Walker *et al.*, 1990). Afortunadamente, con la excepción de los tumores germinales para los cuales no hay modelos de experimentación animal adecuados, el resto de las situaciones clínicas pueden ser producidas en el modelo animal adecuado tras la exposición a los compuestos químicos apropiados. A este respecto, dos hechos son de especial consideración: i) la observación de que de que en los animales de experimentación el impacto de los tratamientos se presenta como un síndrome complejo, presentando mayor o menor severidad en cada uno de sus manifestaciones clínicas; ii) aunque los síntomas clínicos se manifiestan post-natalmente, la causa de base tiene carácter irreversible y está relacionada con la disgenesia testicular durante el desarrollo fetal.

Desde la perspectiva de la clínica humana, uno de los hechos más relevantes es que bajo la luz de la hipótesis del síndrome de disgenesia testicular una gran parte de los problemas derivados tienen un origen pre o perinatal. De hecho esta particularidad es evidente y universalmente aceptada para aquellas enfermedades diagnosticadas en el momento del nacimiento (hipospadias y criptorquidia), pero de menor claridad para el caso del cáncer testicular. Gran parte de la actividad científica del grupo danés durante los últimos veinte años, se centró en la propuesta de que el cáncer testicular tiene origen en las anomalías celulares que se producen durante el desarrollo fetal intrauterino (Giwerzman *et al.*, 1998).

Destaca en la propuesta de un origen prenatal de los cuadros clínicos de referencia la evidencia existente en lo que respecta a la calidad seminal. Se han sugerido tres razones de

diferente significación: i) la relación directa entre calidad seminal y número de células de Sertoli, siendo éste determinado durante la vida fetal y, en cualquier caso, con anterioridad a la pubertad; ii) la ocurrencia de baja cuenta espermática en casos de enfermedades de claro origen intrauterino y perinatal como hipospadias y criptorquidia; iii) la indicación epidemiológica de que la calidad seminal tiene una clara asociación con cohortes de nacimiento.

La hipótesis de una asociación entre las entidades clínicas descritas dentro del síndrome de disgenesia testicular (alteraciones del tracto genitourinario, calidad seminal y cáncer testicular) tiene, en opinión de Skakkebaek y colaboradores, un soporte observacional de indudable interés: i) algunos casos de cáncer testicular ligados a mutaciones génicas se asocian también con criptorquidia e hipospadias (Dieckmann and Skakkebaek, 1999); ii) individuos con cáncer testicular presentan con mayor frecuencia criptorquidia (Moller and Skakkebaek, 1997); iii) los individuos con antecedentes de criptorquidismo son más frecuentemente infértiles que los individuos sin ese problema de desarrollo; iv) el testículo contralateral al que tiene cáncer clínico, presenta frecuentemente las observaciones histológicas del síndrome de disgenesia testicular; v) el cáncer testicular diagnosticado se acompaña de un recuento espermático más bajo de lo esperado para la pérdida de la función de un solo testículo (Berthelsen and Skakkebaek, 1983); vi) alteraciones espermáticas particulares son observadas en algunos individuos que con posterioridad desarrollan cáncer testicular (Moller and Skakkebaek, 1999; Jacobsen *et al.*, 2000) y, por último, vii) los individuos que desarrollan cáncer testicular presentan frecuentemente una fertilidad reducida con anterioridad al desarrollo de la enfermedad (Petersen *et al.*, 1998).

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen AG, Jensen TK, Carlsen, E. et al. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum. Reprod.*, 2000; 15:366-72.
- Ashford N. Miller CS. Low-level chemical exposures: A challenge for science and policy *Environ. Sci. Tech.* 1998; 32:508-9.
- Berthelsen JG and Skakkebaek NE. Gonadal function in men with testis cancer. *Fertil. Steril.*, 1983; 39:68-75.
- Carlsen E. Giwerman A. Keiding, N. Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* 1992; 305:609-13.
- Carson, R. *Silent Spring*. Boston:Houghton Mifflin Company; 1962.
- CEC (2001) Strategy for a Chemicals Policy (White paper, COM (2001) 88 Final), Brussels, Belgium, at http://europa.eu.int/comm/environment/chemicals/0188_en.pdf
- Colborn T. Clement C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/Human Connection. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing; 1992.
- Colborn T. vom Saal FS. Soto AM. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101:378-84.
- COM706. Comisión de las Comunidades Europeas. Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en los sistemas hormonales de seres humanos y animales). Bruselas. 1999.
- Comité Científico de la Toxicidad, la Ecotoxicidad y el Medio Ambiente (SCTEE) de la Comisión. Efectos sobre la salud de las personas y de la fauna de las sustancias químicas alteradoras de los procesos endocrinos, con especial énfasis en la fauna y en los métodos de pruebas sobre ecotoxicidad. Bruselas. 1999.
- Dieckmann KP and Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *Int. J. Cancer*, 1999; 83:815-22.
- Estrogens in the environment I. Conference proceedings. National Institute Environment and Health Sciences. North Carolina, 1997.
- Estrogens in the environment III: Global health implications. *Environ. Health Perspect.* 1995; 103:3-178.
- European Workshops on Endocrine Disrupters; Aronsborg, Sweden. European Commission; 2001.

- Fernández MF; Pedraza V. Olea N. Estrogens in the environment: is there a breast cancer connection?. *Cancer J.* 1998; 11:11-17.
- García-Rodríguez J, García-Martín M, Noguera-Ocaña M, Luna del Castillo JD, Olea N, Lardelli-Claret P. Exposure to xenoestrogens and chryptorchidism: Geographic evidence of a possible association. *Environ. Health Perspect.* 1996; 104:1090-5.
- Giwercman A, Müller J, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the undescended testis. *Sem. Urol.*, 1998; 6:10-119.
- Informe EUR 18345 CEE. La investigación de los alteradores endocrinos en la UE. Bruselas. (1997).
- Jacobsen R, Bostofte E, Engholm G. et al. Fertility and offspring sex ratio of men who develop testicular cancer: a record linkage study. *Hum. Reprod.*, 2000; 15:1958-61.
- Kelce WR, Lambright CR, Gray LE Jr, Roberts KP. Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997; 142:192-200.
- McLachlan JA Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101:386-7.
- Miller WR, Sharpe RM. Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Endocrine-related cancer.* 1998; 5:69-96.
- Møller H. Trends in sex-ratio, testicular cancer and male reproductive hazards: are they connected? *APMIS.* 1998; 106, 232-9.
- Møller H, Skakkebaek NE. Testicular cancer and cryptorchidism in relation to prenatal factors: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control*, 1997; 8:904-12.
- Møller H, Skakkebaek NE. Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. *Br. Med. J.*, 1999; 318:559-62.
- Nef S, Shipman T, Parada LF. A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Dev. Biol.*, 2000; 224:354-61.
- Newbold RR, McLachlan JA. Diethylstilbestrol associated defects in murine genital tract development. In McLachlan, J.A. (ed.), *Estrogens in the Environment, IP Influences on Development.* New York: Elsevier; 1985. p. 228-313.
- Olea N, Molina MJ, García-Martin M, Olea-Serrano, M.F. Modern agricultural practices: The human price. *Comments Toxicol.* 1996; 45574.
- Olea N, Olea-Serrano MF. Estrogens and the environment. *Cancer Prevention J.* 1996; 5:1-6.
- Olea N, Barba A., Lardelli P, Rivas A., Olea-Serrano MF. Inadvertent exposure to xenoestrogens in children. *Toxicol. Industrial Health* 1999; 15:151-8.
- Olea N, Pazos P, Fernández MF, Rivas A., Olea-Serrano MF, Pedraza V. Phyto and mycoestrogens (Xenoestrogens) as a preventable cause of breast cancer. *Med. Biol. Environ. Int. J.* 1999; 27:55-60.
- Petersen PM, Skakkebaek NE, Giwercman, A. Gonadal function in men with testicular cancer: biological and clinical aspects. *APMIS*, 1998; 106:24-36.
- Rajpert-De Meyts E, Toppari J, Skakkebaek NE. Testicular tumors with endocrine manifestations. In De Groot, L.J. and Jameson, J.L. (eds), *Endocrinology*, 4th edn. Philadelphia: Saunders; 2000. Chapter 175.
- Report of Proceedings. European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Weybridge. 1996.
- SACO 100EN. Endocrine disrupting chemicals: A challenge for the EU?. European Parliament, Public Health and Consumer Protection Series, Strasburg, 1998.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 1993; 341, 1392-5.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* 2001; 5:972.-8.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P. et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.*, 1996; 104:741-803.

- Walker AH, Bernstein L, Warren DW et al. The effect of in utero ethinyl oestradiol exposure on the risk of cryptorchid testis and testicular teratomas in mice. *Br. J. Cancer*, 1990; 62:599-602.
- Weidner IS, Møller H, Jensen TK, Skakkebæk NE. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ. Health Perspect.*, 1998; 106:793-6.