

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD SOBRE LA REPRODUCCIÓN Y LA DISRUPCIÓN ENDOCRINA

Guillermo Repetto, Ana del Peso, Jorge Luis Zurita
Coordinador del GTEMA- Grupo de Métodos Alternativos
(<http://tox.umh.es/aetox/gtema/>). Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses,
y Area de Toxicología de la Universidad de Sevilla. Avda Dr Fedriani s/n; 41009 Sevilla.
repetto@us.es



Aunque se encuentran muy relacionados, desde un punto de vista conceptual es conveniente considerar en forma diferenciada, en primer lugar la evaluación de la toxicidad sobre la reproducción, seguido del estudio de la disrupción endocrina.

TOXICIDAD SOBRE LA REPRODUCCIÓN

La reproducción y el desarrollo comprenden una compleja sucesión de procesos fisiológicos encadenados desde la producción de los gametos, la fertilización, la implantación, la organogénesis, el desarrollo fetal, el desarrollo postnatal y la maduración sexual.

La toxicología de la **reproducción** incluye el estudio de los trastornos sobre la fertilidad de los padres y sobre el desarrollo de los hijos (Repetto , 1997).

- Los trastornos tóxicos de la **fertilidad** abarcan los efectos sobre la libido, comportamiento sexual, espermatogénesis, ovogénesis, actividad hormonal, el proceso de fertilización y el desarrollo del huevo fecundado hasta la fase de implantación.
- La toxicología del **desarrollo** comprende los efectos inducidos o manifestados en la época prenatal, así como los que aparecen tras el nacimiento. Se incluyen los efectos embriotóxicos o fetotóxicos como disminución del peso corporal, retraso del crecimiento y del desarrollo, lesiones en los órganos, muerte, aborto, defectos estructurales, funcionales o peri-postnatales, trastornos en la lactancia, y problemas del desarrollo físico o mental.



Las **exigencias reguladoras** de estudios de reproducción y desarrollo son diferentes según el uso previsto para el compuesto, es decir, como medicamento, plaguicida, compuesto industrial, etc. En el caso de compuestos químicos, la Directiva europea 67/548/EEC establece que los compuestos incluidos en el nivel 1 precisan evaluaciones de fertilidad y de teratogénesis en una especie. En los casos de los compuestos de nivel 2, se incluyen además los estudios de reproducción en tres generaciones, de desarrollo peri y postnatal, y de teratogénesis en una segunda especie.

Los ensayos generales por dosis repetidas o el ensayo de dominancia letal pueden orientar sobre algunos de estos efectos. Sin embargo, estos ensayos no son por sí mismos adecuados para detectar alteraciones del desarrollo. En los ensayos de dosis repetidas se administra continuamente en el tiempo el compuesto estudiando los efectos. En el ensayo

de dominancia letal en mamíferos (OECD 478, B22) se detectan efectos mutagénicos en el desarrollo del gameto, pero también interferencias no mutagénicas. Se administra el compuesto una vez o repetidamente a los machos antes de la cópula, y las hembras preñadas se sacrifican antes del parto para estudiar los embriones. Este ensayo puede ampliarse estudiando las glándulas secretorias accesorias y la espermiogénesis en los machos.

El principal objetivo de los estudios de reproducción y desarrollo es detectar los efectos de las sustancias o sus metabolitos sobre la función reproductiva en el adulto, o en el crecimiento, desarrollo y capacidad reproductiva de su descendencia, cuantificándolos según NOAEL.

Principales ensayos regulados para evaluar la toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo

Estudios multigeneracionales en mamíferos		
		Título
414 (2001)		Estudio de desarrollo prenatal
415 (1983)	B34	Estudio de reproducción en una generación
416 (2001)	B35	Estudio de reproducción en dos generaciones
421 (1995)		Método de cribado de toxicidad sobre la reproducción y desarrollo
422 (1996)		Estudio combinado: toxicidad por dosis repetida + cribado de toxicidad sobre la reproducción y desarrollo
426		Neurotoxicidad sobre el Desarrollo
Estudios de toxicidad sobre el desarrollo		
414 (2001)	B31	Estudio de desarrollo prenatal
Estudios en otras especies		
206		Función reproductiva en aves
210	C14	Etapas iniciales en peces
211 (1998)	C20	Ensayo de Reproducción en Daphnia magna
Estudios que pudieran detectar algunos tipos de efectos		
452 (1981)	B30	Estudios de toxicidad crónica
478	B22	Ensayo de dominancia letal

Por lo tanto para detectar las alteraciones consideradas básicamente es preciso realizar dos tipos de estudios:

1. Estudios multigeneracionales
2. Estudios de desarrollo embrio-fetal (teratogenia)

1 Estudios Multigeneracionales de reproducción

Informan de efectos en la libido, potencia y fertilidad, capacidad de desarrollar los embarazos, lactancia, supervivencia pre y postnatal; crecimiento, desarrollo de los hijos y su capacidad reproductiva; e identificación de órganos diana

Se administra la sustancia continuamente a la generación parental antes de la fecundación (P) y a las subsecuentes generaciones (F1, F2, etc.). Actualmente ya no se considera necesario extender rutinariamente los estudios a la tercera generación, ya que aunque ocasionalmente se disminuye el NOAEL, no suelen detectarse más efectos. Por el contrario, puede ser más útil estudiar una nueva camada de las dos primeras generaciones (Bradlow, 2002).



Estos ensayos son complejos, largos, caros y requieren muchas horas de trabajo, por lo que se acepta se realicen en una sola especie, generalmente la rata.

Son estudios relevantes, pero hay que tener en cuenta que existen:

- Diferencias específicas en la cronología de los procesos del desarrollo
- Mayor producción espermática en roedores que en humanos (reserva espermática)
- Mayor supervivencia en la implantación (90 en roedores % frente al 10% en humanos)
- Influencia del papel de la lactancia y cuidado materno.

Dado que se trata de un conjunto muy complejo de posibles efectos, la organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) ha ido adoptando diversos protocolos específicos para la evaluación de los efectos sobre la reproducción en mamíferos, alguno de los cuales son los aceptados por la Unión Europea como procedimientos de evaluación:

- **TG 421 Método de cribado de toxicidad sobre la reproducción y desarrollo** (1995). Es el ensayo de diseño más simple, útil como cribado o para seleccionar dosis en estudios posteriores. Se realiza el sacrificio a las crías a los 4 días de edad, lo que restringe los indicadores estudiados en los hijos (abortos, pérdidas, prematuridad, distocia, fecundidad, proporción de sexos, diferenciación sexual, crecimiento y desarrollo) y limita la investigación de la conducta maternal (tiempo hasta la cópula, conducta sexual, duración de la gestación, habilidad en la lactancia). Se estudian alteraciones anatomopatológicas en los órganos sexuales de los padres, lo que se podría ampliar a los hijos. Se realiza en rata.
- **TG 422 Estudio combinado: toxicidad por dosis repetida y cribado de toxicidad sobre la reproducción y desarrollo** (1996). Se trata de un procedimiento similar al 421, aunque incluye posibles indicadores opcionales, como niveles hormonales, cuerpo luteo, etc, aprovechando mejor los animales del ensayo por dosis repetidas. También se realiza en rata.

- **TG 415/B34 Estudio de reproducción en una generación (1983).** Es similar al anterior, pero podría extenderse para incluir estudios del desarrollo físico y conductual, memoria y aprendizaje. Puede realizarse en rata o ratón.
- **TG 416/B35 Estudio de reproducción en dos generaciones (2001).** Es el ensayo de reproducción mas riguroso en mamíferos entre los protocolos de la OCDE y UE. Supone un estudio profundo de crecimiento, desarrollo y función sexual en la generación F1, con monitorización de la F2. Incluye con mayor profundidad los indicadores comentados en los demás procedimientos. Proporciona información general sobre los efectos en los sistemas reproductivos masculinos y femeninos, incluyendo la función gonadal, el ciclo estrogénico, conducta de copulación, concepción, gestación, parto, lactancia, destete, y crecimiento y desarrollo de las crías. Puede también informar sobre la morbilidad o mortalidad neonatal y el desarrollo. Además del crecimiento y desarrollo de la generación F1 se intenta evaluar la integridad y función reproductiva e la generación F2. La sustancia se administra a los deferentes grupos de machos y hembras desde antes de la cópula y hasta la finalización del estudio con el destete de los hijos de la segunda generación F2. En concreto, los machos deben exponerse al menos durante un ciclo espermático completo (aproximadamente 56 días en ratón y 70 en la rata), y las hembras durante varios ciclos estrogénicos. Se prefiere emplear la rata, al menos 20 ratas preñadas por grupo.
- **TG 426: Neurotoxicidad sobre el Desarrollo (1999).** La sustancia se administra a los animales durante la gestación y la lactancia. La descendencia se selecciona al azar para la evaluación de la neurotoxicidad. La evaluación consiste en observaciones para descubrir gruesas anomalías neurológicas o en el comportamiento; y la valoración de desarrollo físico, ontogenia del reflejo, la actividad motora, y la función motora y sensorial, el aprendizaje y la memoria; y la evaluación neuropatológica durante el desarrollo postnatal y la madurez.

Para la evaluación en no mamíferos destacan los siguientes procedimientos:

- **Función reproductiva en aves (OECD 206):** se administra el compuesto durante al menos 20 semanas. Los huevos se incuban y las crías se observan durante 14 días. Se estudia la supervivencia, conducta, producción y viabilidad de los huevos, grosor del cascarón, y patología básica de las gónadas y glándulas accesorias, que puede ampliarse en profundidad.
- **Etapas iniciales en peces (OECD 210, C14):** se estudian las primeras fases, pero podrían incluirse el crecimiento y desarrollo.
- **Ensayo de reproducción en Daphnia magna (OECD 211):** al comprobar la capacidad reproductiva se detectarían además interferencias hormonales, aunque sin aportar información mecanicista.

Otras entidades que disponen de protocolos similares para evaluar la toxicidad sobre la reproducción y desarrollo son la ASTM- American Society for Testing and Materials, EPA-US

Environmental Protection Agency, FDA-US Food and Drug Administration, ICH- International Conference on Harmonisation, y JMAFF- Japanese ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

2 Estudios de toxicidad sobre el desarrollo: TG 414/ B31 Estudio de desarrollo prenatal (2001)

Su objetivo es identificar efectos letales, **teratogénicos** (malformaciones) o de otro tipo en el embrión o feto, además de los efectos sobre la madre. El tratamiento de las hembras se realiza al menos desde la implantación, hasta el sacrificio un día antes del parto. Se cuentan los embriones y las reabsorciones y muertes fetales, peso fetal (muy sensible), la relación entre sexos, y se estudia detalladamente la morfología externa, visceral y esquelética.

Deben emplearse las especies más relevantes, por ejemplo con metabolismo similar del compuesto a los humanos. En general se producen falsos positivos por tener mayor sensibilidad que los humanos. Se usan obligatoriamente dos especies, una roedora (preferiblemente la rata) y una no roedora (como el conejo). El conejo tiene diferente placenta y fisiología del embarazo que los roedores, y presenta reducción de extremidades con la talidomida, al contrario que la rata. El conejo es inapropiado para antibióticos y materiales poco absorbibles, ya que producen diarrea y reducción del consumo de alimentos, que genera abortos. Desde 2001 se recomienda un mínimo de 20 animales por dosis, frente a los 12 usados antes.

Como procedimientos alternativos para evaluar la embriotoxicidad, el Centro Europeo para la validación de Métodos Alternativos ha validado científicamente (2001) tres ensayos:

- **Un ensayo in vitro con células precursoras Embrionarias de ratón (EST)**, que permite distinguir entre compuestos moderados, fuertes y no embriotóxicos. No precisa de animales por lo que en la actualidad es la mejor opción.
- **El Cultivo de Embrión Completo de rata (WEC)**, con la misma aplicación que el anterior, pero precisando usar roedores
- **El ensayo de cultivo de células disociadas de encefalo de embrión de rata en micromasas (MM)**, que identifica embriotóxicos potentes

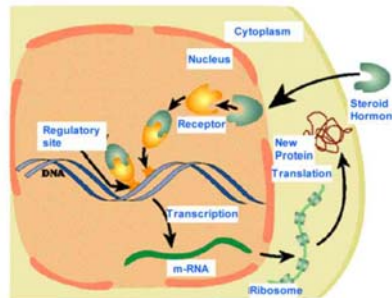
Otros ensayos, como el de Embrión de Rana *Xenopus laevis* (FETAX), no han podido ser validados por ICCVAM, al considerar que precisan optimizarse para su empleo regulatorio (2001).

DISRUPCIÓN ENDOCRINA

Se denominan **disruptores hormonales u endocrinos** a *un conjunto heterogéneo de compuestos químicos con actividad hormonal* (COM, 1999). O expresado de otra manera, *una sustancia exógena o mezcla que altera funciones del sistema endocrino y causa efectos adversos sobre la salud de un organismo intacto, o sus descendientes o sobre (sub)poblaciones* (IPCS 2002).

El sistema endocrino consiste en un conjunto de glándulas tales como el tiroides, gónadas y adrenales, y las hormonas producidas y secretadas al torrente circulatorio como hormonas tiroideas, estrógenos, testosterona, las cuales contribuyen al desarrollo, crecimiento, reproducción y comportamiento de animales y seres humanos.

Se trata por tanto de una definición amplia, que pretende no limitarse a los más conocidos productos con actividad estrogénica, sino permitir la inclusión de otros como los antiandrógenos, o los compuestos con actividad sobre los sistemas tiroideo e hipofisiario.



Aunque no toda la disrupción endocrina se relaciona con alteraciones de la reproducción y desarrollo, éstos han sido hasta ahora los aspectos más estudiados, quizás por haber despertado una gran inquietud social. Interesantes ejemplos son las dificultades en la reproducción de patos silvestres en Arkansas, los efectos teratógenos en aves de los Grandes Lagos de América del Norte, la masculinización o feminización en gasterópodos, peces o aves. En lo que se refiere a la especie humana, se han relacionado con disruptores endocrinos los efectos del DES sobre los hijos, efectos de la dioxina en el accidente de Yu-Cheng, disminución de los niveles de testosterona e incremento de los de LH en trabajadores ingleses expuestos, disminución de la calidad espermática, y aumento de hipospadias, criptorquidismo, cáncer testicular en exposiciones a plaguicidas, etc.

Diversos estudios de campo y de laboratorio han mostrado que la exposición a ciertos disruptores endocrinos ha contribuido a efectos adversos en algunas **especies y poblaciones silvestres**. Estos efectos varían desde cambios sutiles en la fisiología y conducta sexual hasta alteraciones permanentes de la diferenciación sexual. Las especies acuáticas, en la parte alta de la cadena alimentaria son afectadas preferentemente, pero también lo son las terrestres. Algunos efectos adversos están probablemente mediados por cambios endocrinos, pero en la mayoría de los casos no está claro el enlace causal entre la exposición y la disrupción endocrina (IPCS 2002). La población de focas en el Mar Báltico ha disminuido por exposición a organoclorados (PCBs, DDE), pero se desconoce el mecanismo preciso de alteración endocrina que provoca el compromiso reproductivo e inmunitario. El DDT disminuye la población de aves de rapiña por adelgazamiento del cascarón de huevo y desarrollo gonadal. En las aves comedoras de pescado se han observado anomalías

embrionarias (GLEMEDS) relacionadas con exposición a PCB, pero el mecanismo endocrinológico es incierto.

La población de caimanes del lago Apopka (Florida, USA) disminuyó, observándose anomalías gonadales y del desarrollo. Se atribuyó a varios compuestos organoclorados, pero se desconoce la causa precisa de la disrupción endocrina. Tampoco se puede correlacionar la disminución de anfibios a alteraciones por disruptores endocrinos. Los efluentes de fábricas de papel alteran la función endocrina reproductiva en peces, por interacción con receptores hormonales, interferencia en la biosíntesis de esteroides sexuales o alteraciones hipofisarias, pero los mecanismos precisos no se conocen. La exposición de gasterópodos a tributil estaño es un claro ejemplo de efecto adverso mediado por alteración endocrina ambiental en invertebrados. Se produce la disminución poblacional por masculinización de las hembras, probablemente por incremento de andrógenos por alteración de la aromatasa.

Aunque se ha demostrado que los disruptores endocrinos alteran las funciones reproductoras, existe una gran controversia sobre su implicación real en las **poblaciones humanas** (IPCS 2002). Aunque diversos estudios muestran la disminución de la calidad del semen humano en diversos países, no existen datos firmes que la relacionen directamente con la exposición a disruptores endocrinos. La reducción en la proporción de varones se relaciona con influencias externas de mecanismo desconocido. Tampoco se ha demostrado fehacientemente la relación entre la exposición a disruptores y las anomalías en el desarrollo genital masculino, y en concreto con criptorquidismo e hipospadía. También parece equívoca la relación con la endometriosis. En la precocidad en la pubertad existen factores interfirientes como la nutrición que deben ser clarificados. Aunque ciertos disruptores endocrinos como los bifenilos policlorados modifican el desarrollo neurológico, la función neuroendocrina y conductual, probablemente por alteración tiroidea y de la neurotransmisión, aún no se han demostrado los mecanismos endocrinos. Tampoco se ha demostrado el mecanismo endocrinológico que pudiera mediar las alteraciones inmunitarias.

También se indica que la exposición en áreas industrializadas incrementa la incidencia de diversos cánceres hormono-dependientes. La evidencia científica actual no apoya que los disruptores endocrinos incrementen el riesgo de cáncer de mama, particularmente porque probablemente haya habido exposiciones durante el desarrollo, cuando los niveles ambientales de organoclorados eran superiores, que ahora no es posible comprobar. Tampoco apoyan los datos disponibles la correlación con el cáncer endometrial. La incidencia de cáncer testicular, y probablemente de hipospadía y criptorquidismo, se incrementó en 1910 en los países nórdicos, y algo antes en Inglaterra y Gales, por lo que no puede atribuirse solamente a compuestos químicos, que se introdujeron hacia la mitad o finales del siglo XX, no disponiéndose de datos adecuados de exposición. La mayor parte de los estudios no encuentran asociación entre la exposición a plaguicidas y organoclorados y cáncer de próstata, cuyo mecanismo se desconoce. Tampoco se ha demostrado una asociación directa con el cáncer de tiroides.

En conjunto, la plausibilidad biológica del posible daño en ciertas funciones humanas, particularmente la reproducción y el desarrollo, por la exposición a disruptores endocrinos parece consistente teniendo en cuenta las influencias de hormonas exógenas y endógenas en estos procesos. Además, la evidencia de resultados adversos en la vida silvestre y animales de laboratorio expuestos a disruptores endocrinos apoya la preocupación humana. Los cambios en la salud humana en varias áreas son suficientes para justificar la

preocupación y la alta prioridad en su investigación, aunque también deben explorarse otros mecanismos diferentes de la disrupción endocrina.

La **legislación norteamericana** requiere el ensayo de la actividad endocrina de los compuestos (the Food Quality Protection Act of 1996, Public Law 104–170, y the Safe Drinking Water Act Amendments of 1996, Public Law 104–182; 3). Otras regiones en el mundo, particularmente Japón y Europa, están también introduciéndolos en su legislación.

La Comisión de las Comunidades Europeas presentó en 1999 su Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos, y en el 2001 hizo una comunicación sobre su seguimiento. En una primera etapa se seleccionaron 553 compuestos según su producción, persistencia, exposición y efectos sobre la reproducción. De ellos, 118 presentaban características de disrupción endocrina, pero 109 están ya regulados debido a sus características tóxicas o de persistencia. Por ello, los 9 restantes y 3 hormonas se sometieron a evaluación. Los 435 de los que no se dispone de datos suficientes sobre su actividad endocrina deben estudiarse en profundidad.

En la **Unión Europea** la mayoría de las sustancias químicas que alteran el sistema endocrino estarán sujetas a autorización dentro del sistema REACH, lo que justificará que una sustancia se clasifique como carcinogénica o tóxica para la reproducción (CMR). Sin embargo, en la actualidad, ninguno de los protocolos de la OCDE o UE fue diseñado específicamente para detectar disrupción endocrina. De los pocos ensayos en no-vertebrados, el test de reproducción en Daphnias es el único que pudiera ayudara detectar este tipo de efectos.

Las **limitaciones de los actuales procedimientos** de evaluación para detectar efectos adversos mediados por disrupción endocrina han impulsado a diversas agencias reguladoras a tratar de aumentar la sensibilidad de los mismos. Se está ampliando la cobertura de los periodos del desarrollo en los ensayos multigeneracionales de reproducción e incluyendo una serie de nuevos indicadores más profundos, como el estudio de la longitud y normalidad del ciclo estrogénico en las madres y las hijas de la generación F1; el recuento del número de espermatozoides, su viabilidad y morfología, pesado de los testículos, epidídimo, vesículas seminales y próstata, y de un detallado examen anatomopatológico de los testículos en los padres e hijos F1; el control de la edad y peso de las crías el día de la apertura vaginal o separación balanoprepucial; la observación de pezones y areolas en crías macho; la medición de la distancia anogenital en el nacimiento en la generación F2 si se observaron cambios en la proporción de sexos o tiempo de maduración sexual en la F1, etc.

Se han propuesto una gran variedad de **procedimientos específicos** para detectar y cuantificar la capacidad disruptora endocrina, pero existe una gran controversia sobre su verdadera relevancia. Ningún ensayo ha sido aceptado, por lo que ha sido necesario realizar urgentemente estudios de validación de diferentes procedimientos, que aún no han finalizado.

1 Principales ensayos propuestos *in vivo* de disrupción endocrina:

- **Ensayo uterotrófico de 3 días para detectar capacidad estrogénica.** Se controla fundamentalmente el incremento del peso uterino debido a estimulación de la mitogénesis. Se ha comprobado recientemente que pueden emplearse animales inmaduros en vez de adultos ovariectomizados

- **Ensayo de Hershberger de 5 o 7 días para la detección de andrógenos y antiandrógenos en roedores macho.** En este caso se investiga el cambio del peso de vesículas seminales y prostata. Podrían también usarse animales inmaduros en vez de los castrados empleados clásicamente.
- **Ensayo de pubertad en machos durante 30 días con indicadores tiroideos.** Permite también la detección de alteraciones de causa tiroidea exponiendo ratas macho de 23 días y evaluando la pubertad, histología y serología
- **TG 407 Ampliado.** Consiste en ampliar el ensayo de dosis repetidas de 28 días en roedores. Se amplía el estudio histológico y de bioquímica clínica para detectar diversos tipos de alteraciones endocrinas, además de las neurológicas. Podría usarse para cribado.
- **Ensayo in útero de desarrollo (lactancia):** exposición en útero y estudio general de reproducción incluyendo alteraciones neuroconductuales, de actividad, hormonales, malformaciones, pubertad, espermatogénesis...
- **TG 416 Ampliado.** Estudio de reproducción en dos generaciones ampliado con indicadores endocrinas para detectar actividad androgénica, estrogénica, tiroidea y neuroconductual

2 Principales ensayos propuestos *in vitro* de disrupción endocrina:

- **Modelos predictivos de relación estructura actividad (QSAR)**
- **Procedimientos de Unión a receptores**
- **Proliferación celular:** ensayo E, que empleando la línea celular humana MCF-7 detecta estrógenos (y antiestrógenos), o versiones similares usando levaduras.
- **Expresión de genes informadores,** más sensibles que los anteriores
- **Esteroidogénesis en células de Leydig:** producción de testosterona en tejido de testículo
- **Inhibición de aromatasa** y por tanto de la síntesis estrogénica: ej (línea celular humana H295R)

3 Otros ensayos propuestos de disrupción endocrina:

- **Ensayo de metamorfosis en rana.** ej FETAX
- **Vitelogenina en pez**
- **Ensayo de histopatología gonadal en pez**
- **Ensayo multigeneracional en aves**
- **Ensayo multigeneracional de reproducción en pez**
- **Ensayo multigeneracional de reproducción en invertebrados**
- **Inducción de Vitelogenina *in vitro*** (cultivo primario de hepatocitos de aves, peces o anfibios)

En 1999 un comité específico de la Agencia de Protección Ambiental Norteamericana (EDSTAC EPA) propuso un sistema de cribado y ensayo de disruptores endocrinos que está siendo evaluado y transformado en una estrategia integrada, formado básicamente por:

- Tests *in vitro* de unión a receptores y activación transcripcional para estrógenos y andrógenos
- Test *in vitro* de esteroidogénesis en tejido testicular
- Ensayo uterotrófico de 3 días *in vivo* en roedores
- Ensayo de pubertad de 20 días en hembras de roedor con evaluación tiroidea
- Ensayo de Hershberger de 5-7 días en roedores macho

No existe por lo tanto un consenso en los procedimientos útiles para detectar la capacidad disruptora endocrina de los compuestos químicos. Los ensayos actualmente disponibles tanto *in vivo* como *in vitro* sólo indican que una sustancia es un potencial disruptor endocrino en humanos y deberían usarse en forma similar al ensayo de micronúcleo en médula ósea para detectar genotoxicidad (Barlow et al., 2002).

REFERENCIAS

- Barlow S.M., Greig J.B., Bridges J.W., Carere A., Carpye A.J.M., Gallif C.L., Kleinerg J., Knudsen I., Koeter H.B.W.M., Levy L.S., Madsen C., Mayer S., Narbonne J.-F., Pfannkuchl F., Prodanchuk M.G., Smith M.R., Steinberg P. (2002) Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food and Chemical Toxicology* 40 145–191
- Brown, N.A., Spielmann, H., Bechter, R., Flint, O.P., Freeman, S.J., Jelinek, R.J., Koch, E., Nau, H., Newall, D.R., Palmer, A.K., Renault, M.F., Repetto, M.F., Vogel, R. & Wiger, R. (1995). Screening chemicals for reproductive toxicity: the current alternatives. The report and recommendations of ECVAM workshop 12. *ATLA* 23, 868-882.
- Collins T F. X., Sprando R L., Shackelford M E., Hansen D K., y Welsh J J. (1999) Food and Drug Administration Proposed Testing Guidelines for Developmental Toxicity Studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 30, 39–44
- COM 706. (1999) 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. http://www.europarl.eu.int/meetdocs/committees/envi/20000418/123706_es.pdf
- ICH (1993) Harmonised Tripartite Guideline. Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer MJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J (2002) Methods of *in vitro* toxicology *Food and Chemical Toxicology* 40 193–236
- GTEMA (2004) Boletines 22-29 del Grupo de Trabajo Especializado en Métodos Alternativos. Repetto G <http://tox.umh.es/aetox/Grupos/gtema/>
- Holmes P, Humfrey C y Scullion M (1998) Appraisal of Test Methods for Sex-Hormone Disrupting Chemicals Capable of Affecting the Reproductive Process. Prepared by the MRC Institute for Environment and Health for the UK Department of

Environment, Transport and the Regions
<http://www.oecd.org/dataoecd/58/27/1898464.pdf>

- OECD (2001) Detailed Review Paper: Appraisal of Test Methods for Sex Hormone-Disrupting Chemicals Capable of Affecting the Reproductive Process (OECD Monograph No 21) <http://www.oecd.org/dataoecd/47/21/2074124.pdf>
- Repetto M. (1997) Toxicología Fundamental 3ª Ed. Díaz de Santos, Madrid
- Repetto M (2004) "Toxicología de Postgrado-04". Area de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-ROM. Sevilla, ISBN: 84-688-4949-9, Depósito Legal: SE-0211-04
- UE Comisión Europea (2001) Libro Blanco sobre la Estrategia para la Futura Política en Materia de Sustancias y Preparados Químicos. <http://www.europa.eu.int/comm/environment/chemicals/whitepaper.htm>
- WHO/ IPCS (2002) Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., and Van der Kraak, G. (2002). Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. WHO publication no. WHO/IPCS/EDC/02.2. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/pcs/emerg_site/edc/global_edc_TOC.htm
- Worth AP, Balls M (2002) Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects ATLA 30 Supp 1. <http://ecvam.jrc.it/index.htm>

ENLACES EN INTERNET

- El libro Evaluating Chemical and other Agent Exposures for Reproductive and Developmental Toxicity (NRC, 2001), está disponible en la página de la National Academy Press: <http://stills.nap.edu/books/0309073162/html/>
- Organization of Teratology Information Services (OTIS) <http://www.otispregnancy.org/>, que surge de la alianza de 45 centros de información sobre teratógenos norteamericanos.
- TERIS <http://depts.washington.edu/terisweb/teris/index.html> Teratogen Information System y la versión en línea del catálogo Shepard de Agentes Teratogénos
- The National Toxicology Program (NTP) Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (CERHR) <http://cerhr.niehs.nih.gov/>
- e.hormone Web Site <http://e.hormone.tulane.edu> Medio ambiente y hormonas
- Disruptores Endocrinos <http://disruptor.ugr.es/> página sobre disrupción endocrina de la Universidad de Granada
- Credo cluster of research into endocrine disrupter in Europe <http://www.credocluster.info/>
- EU European Commission's Directorate-General of Research which focuses on endocrine disrupter research in Europe. http://europa.eu.int/comm/research/endocrine/index_en.html
- SETAC: <http://www.setac.org>