

ÉSTERES DE FTALATOS - FACTOR ORQUIDOTÓXICO

Stefan M. WALISZEWSKI¹, Grzegorz A. SZYMCZYNSKI², Zbigniew SERAFIN²,
Rosa M. INFANZÓN¹ y José SILICEO¹

¹ Instituto de Medicina Forense de la Universidad Veracruzana, SS Juan Pablo II s/n, Boca del Río Ver., México. Correo electrónico: swal@uv.mx

² Academia de Medicina, Facultad de Medicina, Departamento de Andrología Clínica, Bydgoszcz, Polonia

(Recibido febrero 2001, aceptado febrero 2002)

Palabras clave: ésteres de ftalatos, testículos, toxicidad

RESUMEN

Durante los últimos 50 años, se ha determinado depreciación de los parámetros del semen y un incremento en casos de cáncer testicular, hipospadias y criptorquideas. La exposición ambiental a los ésteres de ftalatos se considera como uno de los posibles factores responsables de estas patologías. Los ésteres de ftalatos se usan en la elaboración de plásticos, pinturas, plaguicidas, empaques e instrumental médico. Administrados a las ratas, causan disminución del peso testicular y atrofia con descamación del epitelio germinal en los túbulos seminíferos. La exposición prepubertal a estos compuestos origina daño testicular severo en los animales adultos. La exposición prenatal se relaciona con la ocurrencia de testículos no descendidos. Se determinó a las células de Sertoli como el blanco de los ésteres de ftalatos. La pérdida del zinc, los cambios en la actividad enzimática, los disturbios en el balance hormonal y el deterioro en la regulación de la apoptosis originado por los ésteres de ftalatos, se analizan como factores que pueden inducir la atrofia testicular.

Key words: phthalate esters, testicles, toxicity

ABSTRACT

A decline of sperm parameters and an increase in testicular cancer, hypospadias and cryptorchidism have been registered in the last 50 years. Environmental human exposure to phthalate esters is one of the suspected factors that cause these changes. The phthalate esters are used in plastics, paints, pesticides, packing materials and medical devices. When administered to male rats, results show a decrease in testicular weight and severe testicular atrophy with desquamation of the germinal epithelium in seminiferous tubules. Prepubertal exposure to these compounds causes serious testicular changes in adult animals. Prenatal exposure influences the occurrence of undescended testes. Sertoli cells were identified as the target of the action of phthalate esters. Zinc delivery, changes in enzyme activity, hormonal disturbance and impairment of apoptosis regulation originated by phthalate esters are discussed as the factors that can induce testicular atrophy.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los estudios rutinarios del semen indicaron una disminución significativa de la cantidad de espermatozoides en el eyaculado humano (Murature *et al.* 1987, Carlsen *et al.* 1992, Auger *et al.* 1995, Harrison *et al.* 1997, Moline *et al.* 2000), lo que impulsó a la Organización Mundial de la Salud a bajar la norma referente a la cantidad de espermatozoides en un mililitro de semen. Paralelamente va en aumento el número de parejas que sufren problemas de fecundidad. La creciente contaminación ambiental y la exposición humana indican deterioro en los sistemas respiratorio, circulatorio y reproductor con la consecuente disminución en la calidad del semen. El estudio epidemiológico concluido en 1995 en París por Auger *et al.* (1995), cuyo objetivo fue comparar algunos parámetros seleccionados del semen recolectado durante los años 1973 a 1992, procedente de 1351 donadores sanos con fertilidad demostrada, reveló la disminución estadísticamente significativa de su calidad. Los parámetros considerados fueron la edad de los donadores y su lapso de abstinencia sexual. El conteo realizado de la densidad media de los espermatozoides en el semen, indicó la disminución de 89 millones/ml a 60 millones/ml, lo que corresponde a la disminución hasta del 2.6 % por año. El porcentaje de los espermatozoides en movimiento decreció en 0.3 % anual y las morfologías correctas disminuyeron en un 0.7 % anual. Este estudio también indicó aumento en la incidencia de hipospadias y de casos de cáncer de testículos, cuya causa se supone está relacionada con mayor contaminación del entorno humano. El estudio de Carlsen *et al.* (1992) sobre el análisis de los parámetros del semen durante 1939 a 1991, indicó un decremento en 42 % (de 113 millones/ml en 1940 a 66 millones/ml en 1990) del número de espermatozoides. Además, se determinó menor volumen de eyaculado y disminución hasta en 50 % del número total de espermatozoides eyaculados. Murature *et al.* (1987) analizaron el número de espermatozoides contenidos en el semen durante 1929 a 1981, lo que indica una disminución causada por la exposición a los contaminantes ambientales. El análisis estadístico que comprende de 1929 a 1965, señaló 108 millones de espermatozoides/ml como la cantidad inicial con una baja del 0.18 millones/ml/año, mientras que en 1949 la densidad media de espermatozoides en el semen fue de 81 millones/ml. El decremento posterior fue de 1.8 millones/ml/año hasta 1981. Se presenta una relación entre la disminución del número de espermatozoides en un mililitro de semen y el desarrollo tecnológico expresado como: aumento del nivel de vida, mayor uso de plásticos, exposición a plaguicidas, plomo, cloro y bromo, ingestión de bebidas alcohólicas, mayor consumo de grasa de origen animal, como carnes rojas y contaminación producida por el incremento del parque vehicular. Los resultados del

análisis estadístico evidenciaron que estos factores se correlacionaron significativamente entre 0.56 y 0.63 (Moller y Skakkebaek 1996).

Harrison *et al.* (1997), Sharpe y Skakkebaek (1993) y Ohlson *et al.* (2000) encontraron correlación estadísticamente significativa entre los parámetros de exposición ambiental que afectan la calidad del semen y la mayor frecuencia de hipospadias, criptorquidias, cáncer de testículos, carcinoma mamario y complejo poliquístico de los ovarios. El desarrollo del carcinoma mamario femenino se señala como un factor de riesgo importante para los hijos, quienes tienen altas probabilidades de desarrollar cáncer de testículos (Moss *et al.* 1986). Otros estudios reportan incrementos del 100 % en la frecuencia de hipospadias y criptorquidias observadas en la población en los últimos 40 años, así como el aumento triple de la frecuencia de cáncer testicular (Giwereman y Skakkebaek 1992, Ekblom y Akre 1998, Moline *et al.* 2000). Del ascenso de estos padecimientos se culpa a un grupo heterogéneo de compuestos químicos, que actúan como disruptores hormonales. A este grupo de compuestos pertenecen los medicamentos con actividad hormonal, fito y micoestrógenos presentes en la dieta, estrógenos que están en la leche y la carne, así como gran cantidad de contaminantes ambientales, incluyendo los plaguicidas organoclorados que se acumulan en los tejidos humanos (Szymczanski y Waliszewski 1983, 1986, Waliszewski y Szymczynski 1983, Stachel *et al.* 1989, Sharpe y Skakkebaek 1993), los bifenilos policlorinados, las dioxinas, los ésteres de ftalatos (Hardel *et al.* 1997), los herbicidas, los fungicidas y los productos de combustión de los hidrocarburos. La presencia en el ambiente de la mayoría de estos compuestos se nota desde los años 1930. El mayor consumo de productos lácteos y el menor consumo de alimentos ricos en fibra, conduce al incremento en la asimilación de los xenoestrógenos y disminución en la cinética de degradación de las hormonas exógenas en el tracto digestivo (Field *et al.* 1990).

La similitud contemporánea a los cambios patológicos observados en el pasado, provocados por el consumo de grandes dosis de anticonceptivos hormonales y dietilstilbestrol, que producían desbalances hormonales, ahora son originados por la exposición ambiental a un gran espectro de compuestos químicos con acción hormonal, propagados en el entorno humano. Se supone que las sustancias que poseen actividad estrogénica leve no producen patologías en los adultos, pero son muy dañinas en algunas etapas críticas del desarrollo individual, como es la reproductora o la menopausia (Sharp y Skakkebaek 1993, Harrison *et al.* 1997). Algunos de los compuestos químicos que interfieren con la actividad de las hormonas sexuales son los ésteres del ácido ftálico (ftalatos), derivados del ácido benzodicarboxílico ilustrados en la **figura 1**.

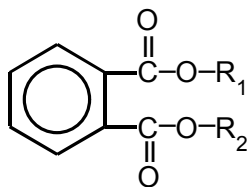


Fig. 1. Estructura química del éster del ácido ftálico

El objetivo de este trabajo es presentar a través de la revisión bibliográfica el efecto de los ésteres de ftalatos, a nivel del sistema reproductor masculino y su posible impacto en la salud de los humanos.

Uso de los ftalatos

Los ésteres de ftalatos encuentran su principal uso como plastificantes, que mejoran la elasticidad y las propiedades adhesivas de los plásticos y de las pinturas, también como vehículo de los plaguicidas. Se hallan en productos de cloruros de polivinilo (PVC) utilizados en las construcciones (tubos, ventanas, aislantes térmicos), plaguicidas (Rutledge *et al.* 1994), cosméticos (Godly y Mortlock 1973, Hausen *et al.* 1995), empaques de alimentos y juguetes (van Lierop 1997). También se utilizan en la elaboración de equipo médico para las transfusiones sanguíneas y líquidos fisiológicos, jeringas, paquetes de diálisis y mascarillas de oxígeno (Roksvaag *et al.* 1990, Mettang *et al.* 1999). Debido a esto, sus residuos se han determinado en sangre (Klos *et al.* 1988, Rock *et al.* 1984), en líquidos de infusión y en sondas de alimentación artificial (Mazur *et al.* 1989), contaminando a los pacientes de terapia intensiva (Ching *et al.* 1981), con respiración artificial (Karle *et al.* 1997), hemodiálisis (Mettang *et al.* 1996, 1996) y receptores de transfusión sanguínea (Plonait *et al.* 1993). Se determinó, que durante las transfusiones sanguíneas los pacientes pueden recibir hasta 300 mg de dietilhexil ftalato (DEHP) (Peakall 1975). Además, concentraciones altas de ésteres de ftalatos se determinaron en agua potable (Onodera 1991), aire, suelo y plantas cercanas a las fábricas de PVC (Vainiotalo y Pfäffli 1990) y aglomeraciones urbanas (Peakall 1975).

La producción total de ftalatos a nivel mundial en los años 1970 se estimó en 3 a 4 millones de toneladas anuales. Las 2/3 partes fueron producidas por los Estados Unidos de América y Europa y el tercer lugar lo ocupó Japón (Wams 1987). El nivel de contaminación ambiental por estos compuestos, se considera como 0.5 mg/kg (Murature *et al.* 1987). La exposición humana diaria varía de 0.5 a 2.0 mg DEHP (Shiota y Nishimura 1982), mientras que la exposición diaria a todos los ésteres de ftalatos

se estima de 15 mg por día, con variaciones de 200 a 300 µg/kg de masa corporal/día (Albro 1986). La gran producción y el uso propagado de estos compuestos químicos originan la contaminación ubicua en el entorno humano expresado por su presencia en agua, suelo, sedimentos, aire, flora y fauna (Sherman *et al.* 1994).

Actividad patológica de los ftalatos

En roedores se ha observado el efecto dañino de los ésteres de ftalatos para el sistema reproductor masculino. Shaffer y col. (1945) al alimentar durante 90 días a ratas con ftalato di-2-etilhexílico (DEHP) en dosis de 1.5 y 5% del peso corporal, observaron atrofia de los canales espermatogénicos y cambios en los testículos, semejantes a la degeneración desarrollada en la senectud. Estos resultados indujeron a estudios posteriores, cuyo objetivo fue esclarecer el mecanismo de su acción tóxica y su influencia en la salud humana.

Los estudios de alimentación de ratas durante 90 días con la dieta fortificada con DEHP, indicaron el aumento de peso del hígado y disminución en los testículos (Gray *et al.* 1977). La dosis que reveló cambios patológicos contundentes fue de 750 mg/kg de peso corporal/día. Las alteraciones histopatológicas consistieron en la disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y la descamación de la mayoría de las células germinales, predominando las células de Sertoli y espermatogonias singulares, mientras que el tejido intersticial no sufrió cambios. Además, en la hipófisis se observó la presencia de células castrales. Cater *et al.* (1976) aplicaron en dosis diaria de 500 y 1000 mg/kg de peso el ftalato dibutílico (DBP), observando después de 4 días de la exposición la disminución significativa de la masa testicular. El DBP marcado con ¹⁴C se acumuló en tejido testicular, mientras que su metabolito monobutílico (MBP) manifestó mayor actividad tóxica enfocada a los testículos.

Los cambios ultraestructurales ocurridos en los testículos, causados por la exposición a los ésteres de ftalatos motivaron varios estudios toxicológicos, cuyos resultados comprobaron su afecto sobre el sistema reproductor masculino. Creasy *et al.* (1987) aplicaron 2200 mg/kg de peso corporal de ftalato di-n-pentílico (DPP) durante 15 semanas y notaron cambios histológicos en los testículos. Los cambios patológicos se limitaron a los túbulos seminíferos en los estados I, II, XI y XIV del desarrollo, lo que indica que las células de Sertoli son blanco, sin que se afecte el balance hormonal. Los cambios a nivel celular comenzaron con la dilución del citoplasma en las partes basales de las células de Sertoli y la disminución de la capacidad adhesiva de las células germinales. Posteriormente, en la parte basal de las células de Sertoli aparecieron vacuolas que obstruían el túbulo. En las espermatidias en desarrollo, se observó aumento de coloración, formación de vacuolas en el citoplasma principalmente en el área de la cola y por consiguiente muerte

celular. La proporción contada de las espermatidias cigótenas versus paquítenas indicó un proceso necrótico. Estos cambios fueron acompañados por un proceso inflamatorio expresado en mayor concentración de neutrófilos en los tejidos intersticiales. La imagen del microscopio electrónico ilustró un ascenso en la densidad electrónica del citoplasma de las células de Sertoli en su parte basal, así como incremento del número de mitocondrias, lo que indica perturbación en el funcionamiento de la membrana mitocondrial causada por la disminución de la actividad enzimática de la deshidrogenasa succínica (SDH) (Creasy *et al.* 1983). Los mayores cambios se han visto en el plasmalema de las células basales. Como consecuencia de las deformaciones en los microtúbulos, se observó la ondulación y dobleces de la membrana celular en los espermatoцитos en la fase de cigóteno o paquíteno. Los compartimentos de las células de Sertoli donde maduran las células germinales, se fragmentaron o se acortaron haciendo contacto directo entre éstas. Se apreció rompimiento del enlace directo entre las células de Sertoli. Además, se observó daño en el retículo endoplásmico, lo que puede expresarse en alteraciones del funcionamiento intercelular de los iones de Ca^{+2} y de la calmodulina. Aparentemente, se han observado pocos cambios en la estructura de las células germinales. Se detectó ondulamiento del plasmalema y degeneración de las espermatidias. La mayoría de las degeneraciones observadas ocurrieron después de 48 horas de haber suspendido el suministro de DPP, permaneciendo la desorganización en el citoplasma de las células de Sertoli y la presencia de células germinales muertas. La conclusión del estudio fue que los ésteres de ftalatos interfieren primero con las células de Sertoli y como efecto secundario, se produce la pérdida de células germinales.

El grado y la persistencia de los daños originados por los ésteres de ftalatos se relacionan estrechamente con las etapas del desarrollo. Los estudios de Gray y Gangolli (1986) realizados con ratas de 4 semanas de edad, a las que se les administró el DEHP en dosis de 2800 mg/kg de peso/día, encontraron la disminución significativa de la masa testicular, de las vesículas seminales y de la próstata. La misma dosis aplicada a las ratas de 10 semanas de edad, reveló daños menores expresados únicamente en la disminución de la masa relativa de los testículos, mientras que en ratas de 15 semanas de edad ninguno de los parámetros observados anteriormente tuvo cambios significativos. En la imagen histológica, las alteraciones características consistieron en la atrofia de los canales seminales principalmente de las ratas más jóvenes, observándose en 50 % en ratas de 10 semanas de edad y sólo en un porcentaje muy bajo en ratas mayores. Estos estudios repetidos con DPP manifestaron toxicidad mayor y su actividad se expresó en patologías de testículos observadas también en el grupo de ratas de mayor edad.

El estudio histológico de los testículos presentó los

misimos daños causados también por el DPP, que se expresa con mayor claridad en las ratas jóvenes (Creasy *et al.* 1983). Se observó la separación de las células germinales y la inflamación aguda del tejido intersticial. La actividad del SDH en las células de Sertoli y en las células germinales fue suprimida después de 24 horas. La administración del DPP en dosis de 2200 mg/kg de peso/día evidencia la presencia de espermatoцитos singulares y de células germinales muertas. Las diferencias en la respuesta patológica y en la intensidad de los cambios dependieron de la edad y estuvieron relacionados sólo con la administración *per os*, dichas patologías no se observaron después de la administración intravenosa (Sjöberg *et al.* 1986). Estas disparidades indican heterogeneidad en la farmacocinética de los ftalatos administrados y no la susceptibilidad tisular, que es la responsable de la gravedad de los daños. Las diferencias en absorción, distribución, metabolismo y excreción indican el grado de exposición de las células de Sertoli a un tóxico. En los estudios mencionados, las observaciones histológicas no señalan disminución significativa de las células de Sertoli (Orth 1986, Berndtson y Thompson 1990).

La excreción del líquido de los túbulos seminíferos y de la proteína que enlaza a las hormonas andrógenas (ABP), se pueden considerar como marcadores de la función de las células de Sertoli. La producción de estos factores fue suprimida durante el estudio de Gray y Gangolli (1986) sólo con dosis de 440 y 2200 mg DEHP/kg de peso corporal. La actividad tóxica del ftalato monoetilhexílico (MEHP) suministrado en dosis de 100 mg/kg de peso corporal, indicó supresión de la excreción de ABP en el 50 % de las ratas estudiadas. La dinámica de los cambios patológicos se observó con mayor claridad en ratas de 4 semanas de edad en comparación con las de 10 y 15 semanas de edad. En el grupo de mayor edad, no se manifestó el efecto patológico del MEHP, indicando a las células de Sertoli como el blanco de los ftalatos.

Los estudios toxicológicos de los ftalatos ubicaron a los di-*n*-alquilo sustituidos como DBP, DEHP y DPP en el rango de los más tóxicos, el último mostró cambios histológicos después de 24 horas de su administración (Gangolli 1982). De los isómeros mono-*n*-butílicos, sólo el *orto*-sustituido posee actividad tóxica. La disparidad en la actividad tóxica de los ftalatos se puede justificar por la variedad de las propiedades físico-químicas tales como distribución, metabolismo y excreción del organismo. La vida media del MEHP en sangre y en testículos, después de la administración del DEHP es más larga que la del MOP (ftalato monoocílico) no tóxico, además en testículos, se determinó su concentración más alta. En consecuencia, la exposición más prolongada a una sustancia tóxica puede afectar en mayor grado el funcionamiento de las células de Sertoli, dañándolas permanentemente. La diversidad de la actividad tóxica de los ésteres de ftalatos puede consistir en la intensidad de su

absorción en el tracto digestivo. Lake *et al.* (1977) señalaron, que los di-*n*-alquil ftalatos con los sustitutos mayores de 6 carbonos, siendo estos prácticamente no tóxicos, se hidrolizan y absorben en menor grado en el intestino delgado de roedores y humanos. Los isómeros con cadena más corta presentan mayor actividad tóxica. Oishi y Hiraga (1983) precisaron, que los ésteres de ftalatos con cadena menor de 2 carbonos ó mayor de 8 no causan atrofia de los testículos.

Las investigaciones conducidas para establecer el modo de acción dañina de los ftalatos para los testículos en cultivo *in vitro* de células de Sertoli y células germinales mostraron, que únicamente los ftalatos monoalquílicos, por ejemplo el MEHP, fueron capaces de desarrollar daño significativo, expresado en la separación de las células germinales de las células de Sertoli. De ello, se puede inducir, que el MEHP en lugar del DEHP es el compuesto responsable del daño causado en las gónadas masculinas. Para extender esta conclusión a otros ftalatos, los estudios realizados con monoésteres del MCHP (ftalato monociclohexílico) (Lake *et al.* 1982), MIBP (ftalato monoisobutílico) and MBP (ftalato monobutílico) (Oishi y Hiraga 1983), evidenciaron atrofia significativa de los testículos después de la exposición. Además Albo *et al.* (1989) determinaron, que el cultivo de células testiculares a diferencia del cultivo de células hepáticas, no fue capaz de metabolizar el MEHP. De allí se puede concluir, que los diésteres de ftalatos son sólo los precursores y necesitan un paso de metabolización hacia monoésteres, que se realiza en los túbulos seminíferos.

Durante los estudios comparados sobre la respuesta individual expresada entre las especies de roedores, se comprobó la resistencia a los ésteres de ftalatos, incluyendo a los monoésteres del cuyo en comparación con la rata y el ratón (Gangolli 1982). Los estudios de Gray *et al.* (1982) aclararon la relativa resistencia del cuyo al DEHP, DBP, MBP y DPP en comparación con otras especies de roedores ya que se observó una disminución estadísticamente no significativa del peso corporal y de la masa testicular y tampoco se manifestaron daños histológicos en las gónadas. La única respuesta dañina fue la atrofia de los túbulos seminíferos y el decremento en la masa relativa de los testículos después del tratamiento con el MEHP, lo que indicó que este compuesto químico fue menos tóxico para el cuyo. La desigualdad en la acción tóxica de los ésteres de ftalatos, se debió a la diferencia de su toxicocinética. Después de la dosificación *per os* una parte del ftalato se determinó en la sangre de los animales estudiados como no metabolizado (Oishi y Hiraga 1980). La velocidad de degradación del DEHP a su monoéster explica la diferencia en la respuesta tóxica observada entre la rata y el cuyo. Después de 16 horas de dosificación a las ratas, el 19 % del DEHP se hidrolizó en MEHP, mientras que en el cuyo se hidrolizó

sólo el 4%. La menor velocidad hidrolítica en el intestino del cuyo, es el único factor que aumenta la resistencia a la actividad tóxica de los ésteres de ftalatos (Waliszewski *et al.* 1999).

Jäckh *et al.* (1984) en su estudio sugirieron una menor potencia tóxica de los ésteres de ftalatos para los primates. Esta aseveración fue comprobada con la administración de 2000 mg de DEHP/kg de peso corporal/día a los primates durante 14 días, sin obtener evidencias claras del daño. La baja respuesta tóxica, se justificó por una menor disponibilidad biológica de los ftalatos en estas especies, así como por una baja respuesta celular debido a la falta de un receptor específico que no se encuentra en los monos ni en humanos (Waliszewski *et al.* 1999).

Los estudios de Dostal *et al.* (1988) señalaron cambios estadísticamente no significativos en la fecundidad de las ratas de 8 a 15 semanas de edad, tratadas en los primeros 6 a 10 días de vida con 200 a 1000 mg/kg de peso corporal de DEHP. No se observaron las patologías esperadas como reducción en el número de células de Sertoli y disminución de la masa testicular. Los autores explican que la degeneración de las células basales conduce a alteraciones en la división celular y a una madurez sexual tardía. En las ratas tratadas, los cambios se limitaron a una pequeña disminución en la densidad de los espermatozoides y en la masa testicular relativa, sin afectar su fecundidad y su capacidad para lograr crías sanas.

Wine *et al.* (1997) realizaron un estudio toxicológico aplicando a las ratas, de tres generaciones consecutivas, dosis de 0.1, 0.5 y 1.0 % del DBP en los alimentos, las que correspondieron a 52, 256 y 794 mg/kg de peso corporal/día. En la primera generación se determinó disminución de la masa corporal y el número de crías vivas, sin cambios en los parámetros del semen. En la segunda generación bajó drásticamente la fecundidad, reflejada en la disminución hasta en un 51 % de la densidad del semen en el grupo de mayor exposición. La tercera generación se caracterizó por el descenso de la masa corporal entre un 6 a 8 % en comparación con las ratas de la primera generación.

La aplicación subcutánea de 1 a 97 g de DEHP/kg de peso corporal administrado en tres dosis, causó disminución de la fecundidad en ratones machos y hembras (Agarwal *et al.* 1986). Los estudios realizados por el US National Institute of Environmental Health Sciences sobre la toxicidad de los ftalatos en ratones nutridos con el alimento fortificado revelaron que de los ratones expuestos a dosis de 760 mg/kg de peso corporal/día de DPP, sólo 4 de 19 parejas lograron crías vivas, mientras que los ratones alimentados con 2160 y 4800 mg/kg no lograron la concepción (Lamb y col. 1997). Un estudio semejante desarrollado con ftalato di-*n*-hexílico (DHP), aplicado en dosis de 380 mg/kg de peso corporal reveló dis-

minución de 30 % en el número de crías y de 72 % de los nacidos vivos. En el grupo alimentado con 800 y 1670 mg/kg no se lograron nacimientos vivos, además se observó la disminución en 93 % de la densidad del semen y 80 % en la movilidad de los espermatozoides, comparado con el grupo testigo (Lamb *et al.* 1997).

Las escasas publicaciones que evalúan las concentraciones de ftalatos en el semen de hombres expuestos, no relacionan las concentraciones determinadas con la patología de los espermatozoides. Los estudios de monitoreo realizados por Szymczynski *et al.* (1985) y Waliszewski y Szymczynski (1989) indicaron la presencia de los siguientes ftalatos en el semen humano: DPP de 0.4 a 4.2 mg/kg, DBP de 1.0 a 8.9 mg/kg y DEHP de 0.4 a 10.0 mg/kg sin relacionarlos con problemas de fecundidad. Murature y col. (1987) al estudiar los niveles de DBP en un grupo de 20 jóvenes, constataron la existencia de dos grupos con capacidad diferente en su metabolismo. En el grupo caracterizado por menor capacidad metabólica de los ftalatos, la concentración del DBP en el semen fue de 0.129 mg/kg, mientras que el grupo con mayor capacidad metabólica presentó 0.051 mg/kg. En los testículos, la actividad del citocromo P₄₅₀ y las enzimas microsómicas de la esteroidogénesis, es inhibida por el DBP, por ello la velocidad en el metabolismo de los ftalatos depende de la actividad individual del citocromo P₄₅₀ en cada organismo humano.

Los estudios de Fredricsson y col. (1993) que utilizan el método computarizado en el análisis del semen, consistente en la influencia de los ésteres de ftalatos en los parámetros de movilidad de espermatozoides humanos, indican su menor movilidad después de la aplicación del DEHP y del DBP en concentraciones de 0.3 y 1.0 mMol/L. De los otros parámetros medidos, se presentó disminución del 25 % en la velocidad lineal de paso del espermatozoide en la unidad de tiempo, a causa de la exposición al DBP en dosis de 2.0 mMol y al DEP en dosis de 3.3 mMol. Mientras tanto, la linealidad y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, no fue influenciada por la presencia de los ftalatos. El método computarizado del análisis del semen se considera como el más objetivo en la evaluación de la capacidad de los espermatozoides para fecundar. Los resultados indican la influencia de los ftalatos en los parámetros de movilidad de los espermatozoides, causando descenso de la fecundidad en los animales tratados.

La exposición a los ftalatos produce también anomalías en el sistema reproductor. El 50 % de las crías machos de las ratas expuestas a dosis de 800 mg de BBP/kg de peso corporal/día, desarrollaron patologías de los conductos seminíferos, expresadas en agénesis e hipoplasia (Waliszewski y Szymczynski 1989). Durante la aplicación de dosis menores, Sharpe *et al.* (1995) y Gray *et al.* (2000) notaron reducción del 10 % de la masa testicular y del 21 % en la densidad de los espermato-

zoides en el líquido seminal. Durante este tratamiento, las ratas hembras recibieron el BBP en dosis media de 366 µg/kg de peso corporal/día, dos semanas antes de su fecundación hasta el final del embarazo. Posteriormente, las crías recién nacidas recibieron dosis de 127 a 274 µg/kg de peso corporal/día hasta las primeras 3 semanas de vida, tiempo que corresponde a la etapa final del desarrollo de las células de Sertoli en las ratas. Los resultados de Sharp *et al.* (1995) concuerdan con los de Sharpe (1994) y Moore *et al.* (2001) en que el tamaño del testículo y la producción de espermatozoides en las ratas depende del número de células basales formadas durante el desarrollo pre y perinatal. En los humanos, el periodo de división de las células de Sertoli se prolonga hasta la edad madura (Cortés *et al.* 1987), por lo que el lapso de tiempo para los factores que bloquean la proliferación de estas células es mucho mayor.

Como describió Imajima *et al.* (1997), la exposición prenatal al MBP puede causar criptorquidismo postnatal. En fetos con 20 días de vida, el 85 % de las ratas revelaron criptorquidismo después de la exposición al MBP desde el día 15 de gestación hasta el 18. La mayor parte de las ratas criptorquídicas mostraron un ascenso de testículos hacia el abdomen. Adicionalmente, los animales expuestos a los ftalatos presentaron criptorquidismo en 84.6 %, tanto bilateral como unilateral entre los 30 a 40 días de vida. Las células de Sertoli pueden jugar un papel muy importante en el descenso transabdominal de los testículos, secretando MIS (sustancia inhibidora de Mullerian, la que actúa como mediadora en la fase del descenso transabdominal. Las patologías observadas en el descenso de testículos, concuerdan con la teoría del deterioro del sistema reproductor originado por los xenoestrógenos, propuesta por Sharpe y Skakkebaek (1993).

Mecanismo de acción

No se conoce bien el mecanismo de la atrofia testicular inducida por los ftalatos. Se han considerado diferentes hipótesis que explican el daño testicular basadas en la deficiencia de zinc, desbalance hormonal, inhibición enzimática y deterioro en la regulación de la apoptosis. Hasta la fecha no se ha reportado la actividad mutagénica de los ftalatos para las células germinales.

Basándose en los estudios histológicos (Creasy *et al.* 1983, 1987) y reproductores (Sharp *et al.* 1995) se supone, que las células de Sertoli son el blanco en la acción tóxica de ftalatos (Jones *et al.* 1993). Las observaciones morfológicas de las células de Sertoli afectadas por los ftalatos indican dos irregularidades en su fisiología, expresadas en la secreción del líquido de los túbulos seminíferos y en las proteínas que enlazan a los andrógenos (Gray y Gangolli 1986). Después de una hora de haber administrado la dosis única de 440 mg DPP/kg de peso, la producción del fluido y de las proteínas enlazadoras de andrógenos fue suprimida totalmente. El MEHP en dosis

única de 1000 mg/kg de peso corporal, redujo en 50 % la producción del fluido seminífero y de proteínas enlazadoras de andrógenos. Debido a las alteraciones de las células de Sertoli ocurridas en la fase temprana del tratamiento con ftalatos y a la afectación inicial de las células germinales, se consideran a las células de Sertoli, como el blanco primario de la actividad de los ftalatos en el daño testicular. Como consecuencia, la pérdida de células germinales conduce a la atrofia tubular.

El zinc

Se comprobó que un menor suministro de zinc en la dieta causa atrofia de los testículos (Gunn y Gould 1970, Oishi y Hiraga 1980). La importancia de este elemento en la fisiología de las gónadas, se ha notado en que la atrofia de los testículos inducida por el cadmio y el manganeso, fue inhibida por la aplicación de zinc (Parizek 1957, Gunn *et al.* 1961, Chandra *et al.* 1975). La administración de cadmio disminuye la fijación de zinc en los testículos y aumenta en los tejidos hepáticos y renales (Gunn *et al.* 1961). Los ftalatos, como es sabido, interfieren en el metabolismo de zinc. Cater *et al.* (1976, 1977) durante la administración de 2000 mg DBP/kg de peso corporal/día observaron un aumento en la excreción de zinc con la orina. Esta tendencia duró aproximadamente los primeros 4 días del estudio, alcanzando un aumento de excreción de 134 a 145 % comparado con el grupo testigo con un pico de 150 a 170 % en el segundo día. La administración del DBP aumentó significativamente el metabolismo de zinc en los testículos, disminuyendo su concentración testicular entre 30 a 36 %, así como la fijación testicular en un 25% y la disminución de la actividad enzimática de la deshidrogenasa alcohólica (ALDH) en las gónadas en 20 a 40 %. La administración paralela de DBP y de zinc protege de los daños y cambios bioquímicos. El mecanismo propuesto de las interferencias en el metabolismo, indica una conjugación no específica de los ftalatos a los iones bivalentes y su mayor excreción, lo que se expresa también en una mayor eliminación del calcio. Las alteraciones en el metabolismo de zinc se han observado después de la administración de DPP, DHP (Foster *et al.* 1980), DEHP (Gray *et al.* 1982, Oishi 1986) y de los monoésteres del MBP, MIBP y MEHP (Oishi y Hiraga 1983). Los cambios en la concentración de zinc fueron paralelos a los cambios histológicos. Se ha observado la acumulación de zinc en hígado y riñones después de la administración del DBP. Estos tejidos se caracterizan por metabolizar el zinc más lentamente en comparación con los testículos, lo que hace que éstos sean más vulnerables a los daños (Foster *et al.* 1980).

Los estudios ultra estructurales e histoquímicos de Foster *et al.* (1982) permitieron describir la localización probable del zinc en las células testiculares. Los mayores depósitos se detectaron en las espermatidias, donde

el zinc se fija en las membranas del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico. Después de 6 horas de administración de una dosis de DPP, antes de manifestarse los cambios morfológicos, se notó una pérdida significativa de estos depósitos, primero en el aparato de Golgi y posteriormente en el retículo endoplásmico. Los estudios citoquímicos sólo detectaron el zinc enlazado a las estructuras celulares, sin encontrar éste elemento en forma libre en el citosol ni asociado a las membranas.

Basándose en estos resultados, surgen dos teorías sobre los mecanismos de la atrofia testicular causada por la falta de zinc. La primera considera que el daño originado por el déficit prolongado de zinc conduce a la disminución en la secreción de gonadotropinas y en la producción de andrógenos (Millar *et al.* 1960). La segunda teoría se refiere a la deficiencia de zinc que origina disturbios en la esteroidogénesis testicular (Lei *et al.* 1976). Uno de estos mecanismos puede participar en la atrofia testicular inducida por los ftalatos.

Después de la exposición a los ftalatos (DEHP, DBP) independientemente de la disminución del nivel de zinc en los testículos, se ha notado también un decremento en la concentración de iones de calcio (Cater *et al.* 1977), magnesio y potasio (Oishi 1986, Zhou *et al.* 1990). Estos cambios son específicos para las gónadas e indican procesos más complejos que los descritos por Cater *et al.* (1977) sobre la reacción de entrelazamiento iónico.

Enzimas

Las células de Sertoli por ser el blanco de la actividad tóxica de los ftalatos, expresan cambios en la actividad enzimática de las gónadas. En las células germinales postmeióticas, la principal actividad enzimática se relaciona con la isoenzima X de la deshidrogenasa láctica (LDH X), la hialuronidasa y la deshidrogenasa del sorbitol. Mientras que en las células de Sertoli y en las espermatogonias la actividad enzimática se relaciona con la de la β -glucuronidasa, la γ -glutamylotranspeptidasa (GGTP) y la deshidrogenasa maleica (MDH) de las células premeióticas de Sertoli y Leydig (Hizeman 1962, Ambadkar y George 1964, Schenkman *et al.* 1965, Blackshaw y Elkington 1970, Males y Turkington 1970, 1971, Mills y Means 1972, Hodgen y Sherins 1973, Shen y Lee 1976, Meistrich *et al.* 1977, Gill y Guraya 1980). La administración del DEHP causa descenso significativo en la actividad de los marcadores celulares postmeióticos y aumento de la GGTP y de la MDH (Oishi 1986). Esto se puede explicar por los cambios en las poblaciones celulares, ya que después de la exposición a los ftalatos, desciende el número de células espermatogénicas y aumenta la cantidad de células somáticas de Sertoli y Leydig. Se ha observado la disminución significativa de la actividad de la deshidrogenasa succínica (SDH) y de la ATP-asa en testículos y ovarios de ratas tratadas con DEHP (Seth *et al.* 1976), mientras que la

actividad de la β -glucuronidasa fue mayor en comparación con las gónadas de testigo (Seth *et al.* 1976, Oishi 1986). La β -glucuronidasa en los testículos expresa la hiperactividad de las células intersticiales como respuesta a la atrofia de los túbulos seminíferos inducida por los ftalatos (Seth *et al.* 1976). Los estudios de Agarwal *et al.* (1986) con ratones expuestos al DEHP revelaron aumento significativo en la actividad de las enzimas lisosómicas: DNasa, RNAasa, β -glucuronidasa y fosfatasa ácida, así como disminución del contenido proteico, de DNA y de RNA en testículos y ovarios.

Los cambios descritos en la actividad enzimática del ciclo de Krebs (SDH y MDH) junto con la disminución observada del consumo de oxígeno por las mitocondrias de las ratas expuestas al DEHP (Oishi 1990), indican disturbios en los procesos energéticos de los testículos. También se ha observado disminución mínima del lactato y aumento significativo del piruvato, causado por la exposición al DEHP (Oishi 1990). Esto se debe al menor consumo de piruvato originado por la disminución en la respiración mitocondrial y al cambio en la actividad de la LDH. Las células germinales dependen del suministro de piruvato y lactato, producidos bajo el testigo de la hormona folículo estimulante (FSH) por las células de Sertoli (Jutte *et al.* 1982, 1983). Es interesante que a pesar de la disminución de la concentración de zinc en los testículos causada por el suministro del DEHP y MEHP, aumente la actividad de las enzimas que contienen zinc como la deshidrogenasa alcohólica y la aldolasa (Oishi 1986).

En resumen, los cambios de la actividad enzimática se presentan paralelamente o como consecuencia de los disturbios morfológicos. Su medición es de gran valor como indicador bioquímico de la atrofia testicular.

Hormonas

Parece que los ftalatos no interfieren en los niveles de testosterona y gonadotropinas (Gray y Butterworth 1980, Gray y Gangolli 1986), pero no es contundente la participación de la testosterona en la atrofia testicular después de la exposición a los ftalatos. Parmar y col. (1987) constataron que la administración simultánea del DEHP y de la testosterona a ratas de 10 semanas de edad, evita daños en las gónadas estudiadas, observados en cortes histológicos y en la determinación de la actividad enzimática. Gray y Butterworth (1980) al administrar DEHP a ratas de 4 semanas de edad combinado con testosterona y FSH no observaron actividad protectora en la atrofia testicular. Posteriormente Oishi (1989) determinó en estudios histológicos el aumento del daño testicular, la disminución de la concentración de zinc y actividad de LDH X en las ratas de 4 semanas de edad, a las cuales se administraron 1000 mg DEHP/kg de peso corporal acompañado con 5 mg/kg de peso corporal de testosterona. Este daño se explica por el aumento en la vida media del DEHP y su metabolito MEHP en los tes-

tículos causado por la testosterona, lo que conduce a una prolongada exposición de las células al factor tóxico, revelado en un mayor daño celular. Probablemente la interferencia en la función de la testosterona es un efecto secundario en el mecanismo de la actividad tóxica de los ftalatos.

La administración de algunos ftalatos interfiere en la secreción de testosterona. Oishi y Hiraga (1979, 1983) observaron aumento del nivel de testosterona testicular y disminución sérica. Después de la exposición al DEHP, se observó una menor concentración de testosterona en la sangre venosa que salía del testículo, cuyo nivel no aumentó después de la aplicación de la hormona gonadotropina coriónica (HCG), a pesar de su aumento en la sangre periférica y en el homogeneizado testicular. La inflamación crónica y la formación de tejido fibroso en el tejido intersticial aumentó la actividad de la β -glucuronidasa, la cual es un marcador fisiológico de las células de Leydig, concluyendo que los ftalatos interfieren en el transporte de la testosterona a través de la barrera sangre-testículo (Seth *et al.* 1976, Agarwal *et al.* 1986). Mientras tanto los estudios de Srivastava y Srivastava (1991) evidenciaron los trastornos inducidos por los ftalatos en la síntesis de la testosterona. Uno de los marcadores bioquímicos de la esteroidogénesis es la deshidrogenasa 17 β -hidroxisteroídica (17 β -HSD). La actividad de esta enzima en los testículos de las ratas estudiadas disminuyó con dosis de 250 y 500 mg DEHP/kg de peso corporal/día administradas durante 15 días, mientras que aplicando dosis de 1000 y 2000 mg, la disminución fue estadísticamente significativa, expresada en valores de 39 y 49 % de los determinados en el grupo testigo. Estos cambios se pueden explicar por el descenso en la concentración o por bloqueo en la respuesta a las gonadotropinas. La hipótesis está apoyada por los resultados de estudios de Agarwal *et al.* (1985, 1986) con BBP indicando que la disminución en la concentración sérica de la testosterona está acompañada por aumento del nivel de hormona luteinizante (LH) y FSH.

Se ha determinado la influencia de los ftalatos sobre la 17 β -HSD (deshidrogenasa de hidroesteroides) hepática. Utilizando las técnicas modernas de análisis de DNA y RNA, se determinó la influencia del DBP sobre la síntesis de la 17 β -HSD IV-isoenzima responsable del catabolismo de los esteroides, que fue identificada en porcinos como deshidrogenasa del 17 β -estradiol (Corton *et al.* 1997). El ftalato administrado en dosis de 0.01 a 0.02 %, visiblemente indujo a la formación de una cadena polipeptídica 17 β -HSD IV en ratas, expresada con mayor fuerza en los machos en comparación con las hembras. La importancia de la 17 β -HSD se elevó después del descubrimiento de la mutación, que inactiva el gen 17 β -HSD III en los machos con pseudo-hermafroditismo (Geissler *et al.* 1994). La actividad de la proteína CYP2C11 característica del sexo masculino, que cata-

boliza la hidroxilación del estradiol en las posiciones 2 y 16, fue afectada después de la exposición a compuestos químicos, como los ftalatos, que proliferan los peroxisomas del hígado (Corton *et al.* 1997). Lo anterior concuerda con las observaciones de que la exposición a este tipo de compuestos químicos aumenta la concentración de estradiol en el suero de los animales machos (Eagon *et al.* 1994). La reacción se debe, después de la administración del DEHP, al bloqueo de la hidroxilación y a la disminución de la concentración de la proteína masculina enlazadora E₂ (MEB) (Eagon y col. 1994). El elevado nivel de estrógenos se relaciona con la hipoplasia de las células de Leydig y con la formación posterior de quistes en estas células (Cook *et al.* 1994).

Apoptosis

La sobreproliferación de las células germinales en condiciones normales es regulada por un fenómeno denominado apoptosis, que se expresa por un mecanismo programado de muerte celular. Este proceso en las ratas jóvenes, se relaciona principalmente con los espermatoцитos, mientras que en las ratas maduras ocurre con las espermatogonias (Allan *et al.* 1992, Bartke 1995, Billing *et al.* 1995). Después de la exposición a factores no favorables de origen exógeno y endógeno, cuando los testículos son incapaces de sostener la espermatogénesis, el proceso de apoptosis aumenta su intensidad. Debido a una estrecha relación entre las células germinales y las de Sertoli, las últimas se señalan como el factor inductor de la apoptosis. Posteriormente, se identificó a la proteína transmembranal (APO-1, CD95) como el factor responsable y capaz de iniciar la apoptosis (Nagata y Goldstein 1995). En dicho proceso participan adicionalmente varios mediadores y moduladores. Las investigaciones de Richburg *et al.* (1996) sobre la influencia del MEHP en el grado de apoptosis de las células germinales de ratas indicaron que el grado de este fenómeno depende de la cantidad de fragmentos moleculares específicos del DNA, medidos con la técnica TUNEL. Se determinó una disminución significativa de este proceso después de 3 horas de exposición *in vivo* a 2000 mg de MEHP/kg de peso corporal. El número de túbulos seminíferos sin células apópticas aumentó del 45 al 63 %, y después de 6 horas disminuyó 35 % y hasta 28 % después de 12 horas de la exposición. Después de tres horas del tratamiento, se observó separación de la espermatogonia de la membrana basal, aumentándose este proceso con el tiempo. Las muestras tomadas de los animales expuestos al MEHP durante 12 horas, analizadas inmunohistoquímicamente para la función del sistema Fas, identificaron en las células de Sertoli a la proteína FasL y a la proteína Fas en las células germinales de los espermatoцитos (Lee *et al.* 1997). Utilizando la técnica TUNEL, el receptor Fas se determinó exclusivamente en los espermatoцитos. En las ratas tratadas aumentó la expresión de Fas y FasL

tal como se desarrolla por daño térmico. El análisis de RNAm con la técnica de PCR confirmó el aumento de la transcripción de ambas proteínas.

Los estudios inmunohistoquímicos al teñir el citoesqueleto de las células de Sertoli revelaron, que en el grupo testigo, los filamentos vimentínicos se radiaron de la fase nuclear. Después de 3 horas del tratamiento con MEHP, se inició una acelerada concentración de la vimentina alrededor del núcleo celular. No se observaron disturbios en el sistema microtubular. Lloyd y Foster (1988) sugieren que el retiro de vimentina de las fibras, las que normalmente permanecen estiradas desde el núcleo celular hasta el plasmalema, provocó un bloqueo en la conductancia de mensajes apópticos hacia las células germinales, causado por el rompimiento de los enlaces celulares o debido al cambio de colocación de los receptores específicos en las membranas. Esta segunda hipótesis es semejante al mecanismo probable de la inhibición del FSH, inducido por el MEHP sobre la respuesta de las células de Sertoli (Lloyd y Foster 1988).

El sistema Fas parece ser un importante elemento en un balance de equilibrio testicular. Probablemente el efecto de los ftalatos sobre la apoptosis de las células germinales se desarrolla en dos fases. En la primera fase, a causa de los disturbios en la función del citoesqueleto, se rompe el enlace Fas-FasL por el cambio en la colocación de la proteína ligadora en el plasmalema de las células de Sertoli. La separación de las células germinales, observada en esta etapa, puede ser inducida por la interferencia en la fuerza de los enlaces o por los cambios enzimáticos. En la segunda fase, los mecanismos auto y paracrínicos desarrollados, aumentan la expresión de genes que codifican Fas y FasL, originando el incremento de la apoptosis de los espermatoцитos.

Vitamina B₁₂

La interferencia en la función de las vitaminas, especialmente la B₁₂ es un factor adicional desarrollado por los ésteres de ftalatos con acción devastadora en los testículos. La deficiencia de vitamina B₁₂ conduce en los testículos a la síntesis anormal de los ácidos nucleicos. A su vez, la carencia prolongada de esta vitamina origina atrofia testicular aguda en ratas (Oishi 1994). En sus estudios Oishi (1994) administró adenosinocobalamina junto con dosis orquidotóxicas de DEHP, observando la acción protectora de la vitamina B₁₂ en el decremento de la masa relativa testicular, en las alteraciones de la espermatogénesis, en la disminución de la actividad enzimática, así como disminución en la concentración de zinc en los testículos. La actividad protectora de la adenosinocobalamina fue selectiva para las gónadas masculinas, mientras que en el hígado se desarrollaron cambios patológicos específicos, producidos por el DEHP. El autor explica la actividad protectora de la vitamina B₁₂ por el hecho de que los ésteres de ftalatos disminuyen la actividad de

la mutasa metilmalonilo CoA directa o indirectamente, reduciendo la concentración de la adenosino-cobalamina que influye en la rapidez de la respiración celular.

La búsqueda de mecanismos de los ésteres de ftalatos para las gónadas masculinas incluyó también cultivos celulares. Se calcula que después de 24 horas de administrar una dosis de 2000 mg de DEHP/kg de peso corporal, los testículos deben absorber 0.025 % de la dosis (Tanaka *et al.* 1975), lo que calculado para el MEHP revela alrededor 2×10^{-4} M en la rata de 100 g de peso. Gray y Beamand (1984) en su investigación de cultivos celulares de testículos de criceto (hámster) y rata tomaron en cuenta esta distribución, mostrando mayor resistencia al MEHP las células procedentes de los animales mayores comparados con los jóvenes. Además, demostraron que *in vivo* sólo los monoésteres de ftalatos poseen actividad dañina, comprobando que después de la administración oral de los ftalatos, su actividad tóxica depende de la hidrólisis en el intestino delgado hacia los mono ésteres (Lake *et al.* 1977, Rowland *et al.* 1977, White *et al.* 1980). Los estudios detallados se enfocan a las células de Sertoli que constituyen el blanco de los ftalatos. La incubación de las células de Sertoli con 10^{-6} a 10^{-4} M de MEHP después de 4 horas indujo el aumento gradual de glicólisis expresada en decremento de la concentración de piruvato y aumento de lactato. Con la concentración de 10^{-6} M disminuye la actividad enzimática de SDH en las mitocondrias aisladas, debido a una inhibición tipo enzima-sustrato (Chapin *et al.* 1988). La inhibición del ciclo de Krebs conduce a la disminución en 20 % del ATP celular. En la imagen morfológica del cultivo de células de Sertoli y germinales, se observa la separación de estas últimas que se notó después de adicionar al medio el MEHP en concentración de 10^{-7} a 10^{-4} M y de MHP, MPP, MBP y el no tóxico *in vivo* MOP (Gray y Beamand 1984). Según Lloyd y Foster (1988) uno de los blancos de los ftalatos es el receptor FSH. Es sabido, que el enlace del FSH con el receptor a través de la adenilciclase, conduce al aumento de AMPc. La incubación del cultivo de células de Sertoli en un medio enriquecido con MEHP en concentración de 10^{-7} a 10^{-4} M lleva a una clara disminución de la respuesta a la FSH. No se logró frenar el aumento del nivel de AMPc en respuesta a la foscolina, la que activa directamente a la adenosilciclase y a la coleratoxina, ésta última estimula a la ciclase a través de la proteína G_i indicando la reacción del MEHP con el receptor FSH. Además, en las concentraciones bajas de ftalato (10^{-8} a 10^{-6} M), se obtuvo sinergismo de la actividad de ambos compuestos. Estos resultados se pueden explicar por dos teorías. La primera indica, que el MEHP puede actuar en concentraciones mayores como antagonista del receptor FSH, mientras que en concentraciones bajas actúa como agonista débil. La segunda indica el carácter lipofílico del ftalato, que puede influir en la conformación del plasmalema de

las células de Sertoli cambiando la colocación del receptor FSH, impidiendo su actividad en concentraciones mayores de MEHP y haciéndolo más accesible para el agonista en concentraciones menores.

La actividad de los ftalatos a través del receptor FSH permite explicar la actividad tóxica mayor *in vivo* observada en los individuos jóvenes, ya que el FSH es indispensable para la iniciación de la espermatogénesis y no tanto para su mantenimiento (Ahmad *et al.* 1973). Dorrington *et al.* (1978) indicaron que con la edad disminuye la dependencia de las células de Sertoli al FSH, mientras que los cultivos de las células de Sertoli no cambian su susceptibilidad a los ftalatos al aumentar la edad de los animales (Heindel y Powell 1992). En conclusión, la mayor susceptibilidad observada *in vivo* en animales jóvenes se debe a mayor dependencia de los testículos al FSH y a la diferencia en el metabolismo de los diésteres de ftalatos. De los monoésteres estudiados, MEHP, MBP y MPP causaron disminución en la respuesta del receptor FSH, mientras que MEP, MMP y MPrP cuyos diésteres no son tóxicos, no frenaron la respuesta del receptor FSH (Heindel y Powell 1992).

CONCLUSIONES

Según Sharpe (1993) la causa de la disminución en la calidad del semen observada actualmente se debe a la exposición a uno o a un conjunto de compuestos químicos, presentes en el ambiente, que afectan la espermatogénesis e influyen en el balance hormonal en la etapa reproductora. La capacidad de producción de espermatozoides en los individuos maduros, puede estar limitada por dos factores: la eficiencia de la espermatogénesis y el número de células de Sertoli. El número de células de Sertoli en un individuo maduro es estable mientras que en la rata se determina hasta 15 días después del nacimiento (Orth *et al.* 1988), en el hombre sucede hasta que concluye la pubertad (Cortes *et al.* 1987). Esto indica mayor posibilidad de acción tóxica de las sustancias que perturban la proliferación de células de Sertoli. El principal factor regulador del número de células basales es probablemente la FSH (Russell y Griswold 1992) y en estudios con animales se ha observado la interacción de los monoésteres de ftalatos con el receptor FSH ubicado en la superficie de las células de Sertoli (Lloyd y Foster 1988). De los estudios realizados con animales referentes al efecto de los ftalatos para el sistema reproductor masculino, queda sólo la pregunta ¿cuáles de los efectos determinados se pueden interpolar al hombre? El mecanismo de la actividad enzimática difiere entre las especies (Waliszewski *et al.* 1999), lo que puede resultar en actividad tóxica diferente para los humanos. Paralelamente, se observa una clara coincidencia entre la mayor exposición humana a los ésteres de ftalatos y la baja ca-

lidad del semen, así como un notable aumento en la incidencia de anomalías del sistema reproductor masculino en recién nacidos (Szymczynski y Waliszewski 1988). Por este hecho se señalan como responsables a los ésteres de ftalatos. Aunque se han publicado resultados de investigaciones que derogan su efecto para la salud humana (Jäckh *et al.* 1984) por otro lado, su gran propagación en el ambiente y su fácil acceso al organismo humano, puede inducir a patologías como las observadas en los animales experimentales. La exposición permanente a dosis subcrónicas causa mayor daño que la exposición a una dosis aguda (Szymczynski y Waliszewski 1988). Es motivo de gran preocupación su presencia en productos para bebés y niños (Bradbury 1996) y la exposición ambiental de las embarazadas en etapa de la organogénesis. En conclusión, es necesario realizar estudios epidemiológicos en la población, para determinar si los ftalatos constituyen un factor asociado a los daños reproductores en humanos, tal como se ha observado en los animales de experimentación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo del Proyecto SEP/FOMES 2000-31-05.

REFERENCIAS

- Agarwal D.K., Eustis S., Lamb J.C. y Kluwe W.M. (1986). Effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on the gonadal physiology, sperm morphology and reproductive performance of male rats. *Environ. Health Perspect.* 65, 343-350.
- Agarwal D.K., Maronpot R.R., Lamb J.C. y Kluwe W.M. (1985). Adverse effects of butyl benzyl phthalate on the reproductive and hematopoietic systems of male rats. *Toxicology* 35, 189-206.
- Ahmad N., Haltmeyer G.C. y Eik-Nes K.B. (1973). Maintenance of spermatogenesis in rats with intratesticular implants containing testosterone or DHT. *Biol. Reprod.* 8, 411-419.
- Albro P. (1986). The biochemical toxicology of di(2-ethyl hexyl) and related phthalates: testicular atrophy and hepatocarcinogenesis. *Rev. Biochem. Toxicol.* 8, 73-119.
- Albro P.W., Chapin R.E., Corbett J.T., Schroeder J. y Phelps J.L. (1989). Mono-2-ethylhexyl phthalate, a metabolite of di(2-ethylhexyl) phthalate, casually linked to testicular atrophy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 100, 193-200.
- Allan D.J., Harmon B.V. y Roberts S.A. (1992). Spermatogonial apoptosis has three recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in rat. *Cell. Prolif.* 25, 241-250.
- Ambadkar P.M. y George J.C. (1964). Histochemical localization of certain oxidative enzymes in the rat testis. *J. Histochem. Cytochem.* 84, 12-24.
- Auger J., Kunstmann J.M., Czyglik F. y Jouannet P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New Engl. J. Med.* 5, 281-285.
- Bartke A. (1995). Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon. *Endocrinology* 136, 3-4.
- Berndtson W.E. y Thompson T.L. (1990). Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *J. Androl.* 11, 429-435.
- Billing H., Furuta I., River C., Tapanainen J., Parvinen M. y Hseuh A.J. (1995). Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependance and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136, 5-12.
- Blackshaw A.W. y Elkington J.S.H. (1970). Developmental changes in lactate dehydrogenase isoenzymes in the testis of immature rat. *J. Reprod. Fertil.* 22, 69-75.
- Bradbury J. (1996). UK panics over phthalates in baby milk formulae. *Lancet* 347, 1541-1543.
- Carlsen E., Giwercman A., Keiding N. y Skakkebaek N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.* 305, 609-613.
- Cater B.R., Cook M.W. y Gangolli S.D. (1976). Zinc metabolism and dibutyl phthalate-induced testicular atrophy in the rat. *Biochem. Soc. Trans.* 4, 652-653.
- Cater B.R., Cook M.W., Gangolli S.D. y Grasso P. (1977). Studies on dibutyl phthalate-induced testicular atrophy in the rat: effect on zinc metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 41, 609-618.
- Chandra S.V., Saxena D.K. y Hasan M.Z. (1975). Effect of zinc on magnese induced testicular injury in rats. *Ind. Health* 13, 51-56.
- Chapin R.E., Gray T.B., Phelps J.L. y Dutton S.L. (1988). The effects of mono-(2-ethylhexyl)phthalate on rat Sertoli cell-enriched primary cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92, 467-476.
- Ching N.P.H., Jham G.N. y Subbarayan C. (1981). Gas chromatographic-mass spectrometric detection of circulating plasticizers in surgical patients. *J. Chromatogr.* 222, 171-177.
- Cook J.C., Hurtt M.E., Frame S.R. y Biegel L.B. (1994). Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in Crl/CD BR (CD) rats. *Toxicologist* 14, 301.
- Cortes D., Müller J. y Skakkebaek N.E. (1987). Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int. J. Androl.* 10, 589-596.
- Corton J.C., Bocos C., Moreno E.S., Meritt A., Cattley R.C. y Gustafsson J-A. (1997). Peroxisome proliferators alter the expression of estrogen-metabolizing enzymes. *Biochimie* 79, 151-162.
- Creasy D.M., Beech L.M., Gray T.J.B. y Bulter W.H. (1987). The ultrastructural effects of di-n-pentyl phthalate on the testis of the mature rat. *Exp. Mol. Pathol.* 46, 357-371.
- Creasy D.M., Foster J.R. y Foster P.M.D. (1983). The morphological development of di-n-pentyl phthalate induced testicular atrophy in the rat. *J. Pathol.* 139, 309-321.

- Dorrington J.H., Fritz I.B. y Armstrong D.T. (1978). Control of testicular estrogen synthesis. *Biol. Reprod.* **18**, 55-64.
- Dostal L.A., Chapin R.E., Stefanski S.A., Harris M.W. y Schwetz B.A. (1988). Testicular toxicity and reduced Sertoli cell number in neonatal rats by di(2-ethylhexyl) phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **95**, 104-121.
- Eagon P.K., Chandar N., Epley M.J., Brady E.P. y Rao K.N. (1994). Di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced changes in liver estrogen metabolism and hyperplasia. *Int. J. Cancer* **58**, 736-743.
- Ekblom A. y Akre O (1998). Increasing incidence of testicular cancer – birth cohort effects. *APMIS* **106**, 225-231
- Field B., Selub M. y Hughes C.L. (1990). Reproductive effects of environmental agents. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **8**, 44-54.
- Foster P.M.D., Foster J.R., Cook M.W., Thomas L.V. y Gangolli S.D. (1982). Changes in ultrastructure and cytochemical localization of zinc in the rat testis following the administration of di-n-pentyl phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **63**, 120-132.
- Foster P.M.D., Thomas L.V., Cook M.W. y Gangolli S.D. (1980). Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **54**, 392-398.
- Fredricsson B., Möller L., Pousette A. y Westerholm R. (1993). Human sperm motility is affected by plasticizers and diesel particle extracts. *Pharmacol. Toxicol.* **72**, 128-133.
- Gangolli S.D. (1982). Testicular effects of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* **45**, 77-84.
- Geissler W.M., Davis D.L., Wu L., Bradshaw K.D., Patel S., Mendonca B.B., Elliston K.O., Wilson J.D., Russell D.W. y Andersson S. (1994). Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nature Genet.* **7**, 34-39.
- Gill S.K. y Guraya S.S. (1980). Effect of low doses of α -chlorhydrin on phosphatase, β -glucosidase, β -glucuronidase and hyaluronidase of rat testis and epididymis. *Ind. J. Exp. Biol.* **18**, 1351-1352.
- Giwercman A. y Skakkebaek N.E. (1992). The human testis – an organ at risk? *Int. J. Androl.* **15**, 373-375.
- Godly E.W. y Mortlock A.E. (1973). The determination of di-n-alkyl phthalates in cosmetic preparations by gas-liquid chromatography. *Analyst* **98**, 493-501.
- Gray L.E.Jr., Ostby J., Furr J., Price M., Veeramachaneni D.N. y Parks L. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of male Rat. *Toxicol. Sci.* **58**, 350-365.
- Gray T.J.B., Butterworth K.R., Gaunt I.F., Grasso P. y Gangolli S.D. (1977). Short-term toxicity study of di-(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Food Cosmet. Toxicol.* **15**, 389-399.
- Gray T.J.B. y Butterworth K.R. (1980). Testicular atrophy produced by phthalate esters. *Arch. Toxicol. Suppl.* **4**, 452-455.
- Gray T.J.B., Rowland I.R., Foster P.M.D. y Gangolli S.D. (1982). Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol. Lett.* **11**, 141-147.
- Gray T.J.B. y Beamand J.A. (1984). Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. *Food Chem. Toxic.* **22**, 123-131.
- Gray T.J.B. y Gangolli S.D. (1986). Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* **65**, 229-235.
- Gunn S.A., Gould T.C. (1970). The testicular effects following decreased zinc administration. En: *Cadmium and other mineral elements in the testes* (A.D. Johnson, W.R. Gomes y N.L. Vandemark, Eds.) Academic Press, Nueva York/ Londres, Vol. 3, pp. 377-481
- Gunn S.A., Gould T.C. y Anderson W.A.D. (1961). Competition of cadmium for zinc in rat testis and dorsolateral prostate. *Acta Endocrinol.* **37**, 24-30.
- Gunn S.A., Gould T.C. y Anderson W.A.D. (1961). Zinc protection against cadmium injury to rat testis. *Arch. Pathol.* **71**, 247-281.
- Hardel L., Ohlson C.G. y Fredrikson M. (1997). Occupational exposure to polyvinyl chloride as a risk factor for testicular cancer evaluated in a case-control study. *Int. J. Cancer* **73**, 828-830.
- Harrison P.T.C., Holmes P. y Humfrey C.D.N. (1997). Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *Sci. Total Environ.* **205**, 97-106.
- Hausen B.M., Milbrodt M. y Koenig W.A. (1995). The allergens of nail polish. (1) Allergenic constituents of common nail polish and toluenesulfonamide-formaldehyde resin (TS-F-R). *Contact Dermatitis* **33**, 157-164.
- Heindel J.J. y Powell C.J. (1992). Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**, 116-123.
- Hizeman J.W. (1962). Development of enzyme activity in the Leydig cells of the mouse testis. *Anat. Rec.* **143**, 351-361.
- Hodgen G.D. y Sherins R.J. (1973). Enzymes as markers of testicular growth and development. *Endocrinology* **93**, 985-989.
- Imajima T., Shono T., Zakaria O. y Suita S. (1997). Prenatal phthalate causes cryptorchidism postnatally by inducing transabdominal ascent of the testis in fetal rats. *J. Pediatr. Surg.* **32**, 18-21.
- Jäckh R., Rhodes C., Grasso P. y Carter J.T. (1984). Genotoxicity studies on di-(2-ethylhexyl) phthalate and adipate and toxicity studies on di-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat and marmoset. *Food. Chem. Toxicol.* **22**, 151-155.
- Jones H.B., Garside D.A., Liu R. y Roberts J.C. (1993). The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Molec. Pathol.* **58**, 179-193.
- Jutte N.H.P., Jansen R., Grootegoed J.A., Rommerts F.F.G., Clausen O.P.F. y van der Molen H.J. (1982). Regulation of survival of rat pachyten spermatocytes by lactate supply

- from Sertoli cells. *J. Reprod. Fertil.* **65**, 431-438.
- Jutte N.H.P., Jansen R., Grootegoed J.A., Rommerts F.F.G. y van der Molen H.J. (1983). FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil.* **68**, 219-226.
- Karle V.A., Short B.L., Martin G.R., Bulas D.I., Getson P.R., Luban N.L., O'Brien A.M. y Rubin R.J. (1997). Extracorporeal membrane oxygenation exposes infants to the plasticizer, di(2-ethylhexyl)phthalate. *Crit. Care Med.* **25**, 696-703.
- Klos M., Nowicki P. y Sobecka B. (1988). The effect of plasticizers of pharmaceutical bags on biochemical and morphological changes of morphotic blood elements. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **32**, 103-107.
- Lake B.G., Foster J.R., Collins M.A., Stubberfield C.R., Gangolli S.D. y Srivastava S.P. (1982). Studies on the effects of orally administered dicyclohexyl phthalate in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **51**, 217-226.
- Lake B.G., Phillips J.C., Linnell J.C. y Gangolli S.D. (1977). The in vitro hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxic. Appl. Pharmacol.* **39**, 239-248.
- Lamb IV J.C., Gulati D.K., Mounce R., Shaver S. y Poonacha K.B. (1997). Reproductive toxicology. Di-n-pentylphthalate. *Environ. Health Perspect.* **105**, suppl. 1, 255-256.
- Lamb IV J.C., Reel J., Lawton D. y Meyers C. (1997). Reproductive toxicology. Di-n-hexylphthalate. *Environ. Health Perspect.* **105**, suppl. 1, 251-252.
- Lee J., Richburg J.H., Younkin S.C. y Boekelheide K. (1997). The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* **138**, 2081-2088.
- Lei K.Y., Abbasi A. y Prasad A.S. (1976). Function of the pituitary-gonadal axis in zinc-deficient rats. *Amer. J. Physiol.* **230**, 1730-1732.
- Lloyd S.C. y Foster P.M.D. (1988). Effect of mono-(2-ethylhexyl)phthalate on follicle-stimulating hormone responsiveness of cultured rat Sertoli cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **95**, 484-489.
- Males J.L. y Turkington R.W. (1970). Hormonal regulation of hyaluronidase during spermatogenesis in the rats. *J. Biol. Chem.* **245**, 6329-6334.
- Males J.L. y Turkington R.W. (1971). Hormonal control of lysosomal enzymes during spermatogenesis in the rat. *Endocrinology* **88**, 579-588.
- Mazur H.I., Stennett D.J. y Egging P.K. (1989). Extraction of diethylhexylphthalate from total nutrient solution-containing polyvinyl chloride bags. *Japan. J. Parenter. Enteral. Nutr.* **13**, 59-62.
- Meistrich M.L., Trostle P.K., Frapart M. y Erickson R.P. (1977). Biosynthesis and localization of lactate dehydrogenase isoenzyme X in pachytene spermatocytes and spermatids of mouse testis. *Dev. Biol.* **60**, 428-441.
- Mettang T., Thomas S., Kiefer T., Fischer F.P., Kuhlmann U., Wodarz R. y Rettenmeier A.W. (1996). The fate of leached di(2-ethylhexyl)phthalate in patients undergoing CAPD treatment. *Perit. Dial. Int.* **16**, 58-62.
- Mettang T., Thomas S., Kiefer T., Fisher F.P., Kuhlmann U., Wodarz R. y Rettenmeier A.W. (1996). Uraemic pruritus and exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **11**, 2439-2443.
- Mettang T., Alscher D.M., Magnus Ch.P., Dunst R., Kuhlmann U. y Rettenmeier A.W. (1999). Phthalic acid is the main metabolite of plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate in peritoneal dialysis patients. *Adv. Periton. Dial.* **15**, 229-232.
- Millar M.J., Elcoate P.V., Fisher M.I. y Mawson C.A. (1960). Effect of testosterone and gonadotropin injections in the sex organ development of zinc-deficient male rats. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **38**, 1457-1466.
- Mills N.C. y Means A.R. (1972). Sorbitol dehydrogenase of rat testis: changes of activity during development, after hypophysectomy and following gonadotrophic hormone administration. *Endocrinology* **91**, 147-156.
- Moline J.M., Golden A.L., Bar-Chama N., Smith E., Rauch M.E., Chapin R.E., Perreault S.D., Schrader S.M., Suk W.A. y Landrigan P.J. (2000). Exposure to hazardous substances and male reproductive health: a research framework. *Environm. Health Perspect.* **108**, 803-813.
- Moller H. y Skakkebaek N.E. (1996). Risk of testicular cancer and cryptorchidism in relation to socio-economic status and related factors: case-control studies in Denmark. *Int. J. Cancer* **66**, 287-293.
- Moore R.W., Rudy T.A., Lin T.-M., Ko K. Y Peterson R.E. (2001). Abnormalities of sexual development in male rats in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* **109**, 229-237.
- Moss A.R., Osmond D., Rachetti P., Torti F.M. y Gurgin V. (1986). Hormonal risk factors in testicular cancer: a case control study. *Am. J. Epidemiol.* **124**, 39-52.
- Murature D.A., Tang S.Y., Steinhardt G. y Dougherty R.C. (1987). Phthalate esters and semen quality parameters. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **14**, 473-477.
- Nagata S. y Goldstein P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456.
- Oishi S. y Hiraga K. (1979). Effect of phthalic acid esters on gonadal function in male rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **21**, 65-67.
- Oishi S. y Hiraga K. (1980). Effects of phthalic acid esters on mouse testes. *Toxicol. Lett.* **5**, 413-416.
- Oishi S. y Hiraga K. (1980). Testicular atrophy induced by phthalic acid monoesters: effect of zinc and testosterone concentrations. *Toxicology* **15**, 197-202.
- Oishi S. y Hiraga K. (1983). Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl) phthalate: effect of zinc supplement. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **70**, 43-48.
- Oishi S. (1986). Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate: changes in histology, cell specific enzyme activities and zinc concentrations in rat testis. *Arch. Toxicol.* **59**, 290-295.

- Oishi S. (1989). Effects of co-administration of di(2-ethylhexyl)phthalate and testosterone on several parameters in the testis and pharmacokinetics of its mono-de-esterified metabolite. *Arch. Toxicol.* **63**, 289-295.
- Oishi S. (1990). Effects of phthalic acid esters on testicular mitochondrial functions in the rat. *Arch. Toxicol.* **64**, 143-147.
- Oishi S. (1994). Prevention of di(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy in rats by co-administration of the vitamin B₁₂ derivative adenosylcobalamin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **26**, 497-503.
- Ohlson C-G. y Hardell L. (2000). Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics. *Chemosphere* **40**, 1277-1282.
- Onodera S. (1991). Characterization and determination of organic compounds in the mutagenic XAD-2 extracts of drinking water. *J. Chromatogr.* **557**, 413-427.
- Orth J.M. (1986). FSH-induced Sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by β -endorphin produced in the testis. *Endocrinology* **119**, 1876-1878.
- Orth J.M., Gunsalus G. y Lamperti A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* **12**, 787-794.
- Parizek J. (1957). The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc. *J. Endocrinol.* **15**, 56-63.
- Parmar D., Srivastava S.P. y Seth P.K. (1987). Effect of testosterone on the testicular atrophy caused by di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Toxicol. Lett.* **36**, 297-308.
- Peakall D.B. (1975). Phthalate esters: occurrence and biological effects. *Residue Rev.* **54**, 1-41.
- Plonait S.L., Nau H., Maier R.F., Wittfoht W. y Obladen M. (1993). Exposure of newborn infants to di-(2-ethylhexyl)-phthalate and 2-ethylhexanoic acid following exchange transfusion with polyvinylchloride catheters. *Transfusion* **33**, 598-605.
- Richburg J.H. y Boekelheide K. (1996). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **137**, 42-50.
- Rock G., Tocchi M., Ganz P.R. y Tackaberry E.S. (1984). Incorporation of plasticizer into red cells during storage. *Transfusion* **24**, 493-498.
- Roksvaag P.O., Simstad G. y Waaler T. (1990). The covariation of chemical concentration, particulate matter and turbidity in soft polyvinyl chloride infusion bags. *Acta Pharm. Nord.* **2**, 327-332.
- Rowland I.R., Cottrell L.D. y Phillips J.C. (1977). Hydrolysis of phthalate esters by the gastro-intestinal contents of the rat. *Food. Cosmet. Toxicol.* **15**, 17-21.
- Russell L.D. y Griswold M.D. (1992) *The Sertoli cell*. Cache River Press Clearwater, FL 1-856, p.186.
- Rutledge L.C., Gupta R.K., Wirtz R.A. y Buescher M.D. (1994). Evaluation of the laboratory mouse model for screening topical mosquito repellents. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **10**, 565-571.
- Schenkman J.B., Richert D.A. y Weterfeld W.W. (1965). α -Glycerophosphate dehydrogenase activity in rat spermatozoa. *Endocrinology* **76**, 1055-1061.
- Seth P.K., Srivastava S.P., Agarwal D.K. y Chandra S.V. (1976). Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on rat gonads. *Environ. Res.* **12**, 131-138.
- Shaffer C.B., Carpenter C.P. y Smyth H.F.Jr. (1945). Acute and subacute toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate with note upon its metabolism. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* **27**, 130-135.
- Sharpe R.M. (1993). Declining sperm counts in men – is there an endocrine cause? *J. Endocrinol.* **136**, 357-360.
- Sharpe R.M. (1994). Regulation of spermatogenesis. En: *The physiology of reproduction* (E. Knobil y J.D. Neill, Eds.). Raven Press 2a. ed. Nueva York, pp. 1363-1434.
- Sharpe R.M. y Skakkebaek N.E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* **341**, 1392-1395.
- Sharpe R.M., Fisher J.S., Millar M.M., Jobling S. y Sumpter J.P. (1995). Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Perspect.* **103**, 1136-1143.
- Shen R-S. y Lee I.P. (1976). Developmental patterns of enzymes in mouse testis. *J. Reprod. Fertil.* **48**, 301-305.
- Sherman M., Read W.A., Castle L. y Gilbert J. (1994). Levels of di(2-ethylhexyl)phthalate and total phthalate esters in milk, cream, Butter and cheese. *Food Addit. Contam.* **11**, 375-385.
- Shiota K. y Nishimura H. (1982). Teratogenicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environ. Health Perspect.* **45**, 65-70.
- Sjöberg P., Lindqvist N.G. y Plöen L. (1986). Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.* **65**, 237-242.
- Srivastava S. y Srivastava S.P. (1991). Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in testis of rat. *Toxicol. Lett.* **57**, 235-239.
- Stachel B., Dougherty R.C., Lahl U., Schlösser M. y Zeschmar B. (1989). Toxic environmental chemicals in human semen: analytical method and case studies. *Andrologia* **21**, 282-291.
- Szymczyński G.A. y Waliszewski S.M. (1983). Chlorinated pesticide residues in testicular tissue samples. *Pesticides in human testicles. Andrologia* **15**, 696-698.
- Szymczyński G.A., Waliszewski S.M. y Haduch G. (1985). Some phthalate esters in human semen. *J. Androl.* **6 suppl.**, M-59.
- Szymczyński G.A., Waliszewski S.M., Tuszewski M. y Pyda P. (1986). Chlorinated pesticides levels in human adipose tissue in the district of Poznan. *Environ. Sci. Health* **A21**, 5-14.
- Szymczyński G.A. y Waliszewski S.M. (1988). Ftalany – czynnik orchidotoksyczny. En: *Postepy Andrologii* (G.A. Szymczyński Ed.) PWN Polonia **Vol 2**, pp. 121-129.
- Tanaka A., Adachi T., Takahashi T. y Yamaha T. (1975). Biochemical studies on phthalic esters. I. Elimination, distribution and metabolism of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicology* **4**, 253-264.
- Vainiotalo S. y Pfaffli P. (1990). Air impurities in the PVC plastics

- processing industry. *Ann. Occup. Hyg.* **34**, 585-590.
- van-Lierop J.B. (1997). Enforcement of food packaging legislation. *Food Addit. Contam.* **14**, 555-560.
- Waliszewski S.M. y Szymczynski G.A. (1983). Determination of selected chlorinated pesticides, bound and free, in human semen. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **12**, 577-580.
- Waliszewski S.M. y Szymczynski G.A. (1989). Determination of phthalate esters in human semen. *Andrologia* **22**, 69-73.
- Waliszewski S.M., Aguirre Gutiérrez A.A., Valencia Quintana R., Infanzón Ruiz R.M., Infanzón R. (1999). Factores que influyen en el metabolismo de los plaguicidas. *La Ciencia y el Hombre* **31**, 23-39
- Waliszewski S.M., Valencia Quintana R., Aguirre Gutiérrez A.A., Infanzón Ruiz R.M. (1999). Actividad tóxica de la 2,3,7,8-TCDD para los humanos. *La Ciencia y el Hombre*, **31**, 89-101.
- Wams T.J. (1987). Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant – a review. *Sci. Total Environ.* **66**, 1-16.
- White R.D., Carter D.E., Earnest D. y Mueller J. (1980). Absorption and metabolism of three phthalate diesters by the rat small intestine. *Food. Cosmet. Toxicol.* **18**, 383-386.
- Wine R.N., Li L-H., Barnes L.H., Gulati D.K. y Chapin R.E. (1997). Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.* **105**, 102-107.
- Zhou Y., Fukuoka M. y Tanaka A. (1990). Mechanisms of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. Part 3. Changes in the activity of some enzymes in the Sertoli and germ cells, and in the levels of metal ions. *J. Appl. Toxicol.* **10**, 447-453.