

RESEÑA ANALÍTICA

Modelos *in vivo* más usados para la identificación de disrupción endocrina potencial del aparato reproductor

Balia Pardo Acosta y Rafael Gámez Menéndez.

Departamento de Toxicología, Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: balia.pardo@cnic.edu.cu

Recibido: 17 de junio de 2008. Aceptado: 4 de noviembre de 2008.

Palabras clave: agentes mutagénicos endocrinos del aparato reproductor; actividad androgénica, actividad estrogénica, actividad antiandrogénica, actividad antiestrogénica.

Key words: endocrine disruptors of reproductive apparatus, androgenic activity, estrogenic activity, antiestrogenic activity and antiandrogenic activity.

RESUMEN. Actualmente, existe gran preocupación científica debido a los efectos que puede causar la exposición a sustancias químicas que tienen el potencial de provocar disrupción endocrina en la vida silvestre y los seres humanos. Diferentes organismos internacionales han propuesto diversas baterías de ensayos toxicológicos y bioensayos *in vitro* e *in vivo* para la identificación de disruptores endocrinos. El presente trabajo, por tanto, pretendió divulgar la metodología para realizar los ensayos *in vivo* que permiten identificar las sustancias que puedan conducir a la disrupción endocrina del aparato reproductor y que cumplen la condición de estar validados por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico. El ensayo uterotrófico ha sido empleado para evaluar la actividad estrogénica o antiestrogénica en diferentes especies, principalmente en roedores tales como ratas hembras inmaduras y adultas ovariectomizadas. El ensayo de Hershberger es uno de los ensayos validados para determinar disruptores endocrinos potenciales en ratas machos castrados, en el cual la acción de un agonista o un antagonista androgénico puede ser identificada por el aumento o disminución significativo del peso de los órganos y tejidos sexuales de los animales tratados versus los controles. Los ensayos uterotrófico y de Hershberger son de fácil realización, sensibles y reproducibles, siendo muy útiles en la evaluación del potencial tóxico de nuevas sustancias.

ABSTRACT. Currently, there is a big concern about the deleterious effects due to the exposure to chemical substances that produce endocrine disruption on the wild life and human beings. For the identification of endocrine disruptors, different international organisations have proposed several batteries of *in vitro* and *in vivo* toxicological assays and bioassays. The present work, therefore, seeks to disclose the methodology to carry out *in vivo* assays that allow to identify the substances that can drive to endocrine disruption in the reproductive apparatus and that complete the condition of being validated by Organization for Economic Cooperation and Development. The uterotrophic assay has been used to evaluate *in vivo* estrogenic or antiestrogenic activity in different species, mainly in rodents, like female immature and mature ovariectomized (ovx) rats. Hershberger assay is one of those validated by the Organization for Economic Cooperation and Development to determine potential endocrine disruptors of reproductive apparatus in castrated male rats, in which the action of a potential androgenic agonist or antagonist can be identified by significant increase or decrease in the weight of the sexual organs and tissues of treated versus control animals. Both the uterotrophic and Hershberger assays are easy, sensitive and reproducible, being very useful for assessing the potential toxicity of new substances.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, existe gran preocupación científica por los efectos que puede causar la exposición a un grupo de sustancias químicas que tienen el potencial de alterar el funcionamiento normal del sistema endocrino en la vida silvestre y los seres humanos. Estos agentes son responsables de causar efectos adversos en la vida silvestre y los ecosistemas, el aumento en la incidencia de enfermedades endocrinas en humanos y en animales de experimentación expuestos a la influencia de sustancias o productos químicos ambientales.

Los disruptores endocrinos (DE) son sustancias químicas exógenas al organismo animal o humano que tienen actividad hormonal o antihormonal y que, actuando como agonistas o antagonistas hormonales,

pueden alterar la homeostasis del sistema endocrino en un organismo intacto, su progenie o sus poblaciones.¹⁻³

Los DE conocidos comprenden más de 560 sustancias, incluyendo hormonas sintéticas y naturales, sustancias vegetales, medicamentos,⁴ pesticidas de amplio uso,³ componentes derivados de la actividad industrial,³ los vehículos,⁵ productos de higiene dental⁶ y otros contaminantes.² Muchos de estos productos se encuentran ampliamente difundidos en el ambiente. Algunos son persistentes, pueden ser transportados a largas distancias y han sido encontrados prácticamente en todas las regiones del mundo. Otros son degradados rápidamente en el ambiente o en el interior del cuerpo humano, pudiendo estar presentes solo por corto tiempo, pero durante períodos críticos de desarrollo.³

Un disruptor endocrino potencial (DEP) es una sustancia o mezcla de sustancias exógenas que posee propiedades que podrían causar disrupción endocrina en un organismo intacto, su progenie o sus poblaciones, reservándose esta acepción para aquellos compuestos químicos en que se carece de información sobre los efectos en el animal intacto.³

Este trabajo pretendió divulgar la metodología de ensayos *in vivo*, validados por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico, que permite identificar las sustancias que puedan conducir a una disrupción endocrina del aparato reproductor por la importancia que presenta la correcta funcionalidad de las hormonas sexuales en el organismo.

MECANISMOS DE DISRUPCIÓN ENDOCRINA

Los DE son capaces de influir sobre las acciones hormonales a través de dos mecanismos fundamentales: a) afectar el papel de los esteroides endógenos por interacción directa (agonista o antagonista) con los receptores de estrógenos y andrógenos ubicados en la membrana o en el núcleo y b) modificar las concentraciones de las hormonas sexuales o de sus receptores como consecuencia de acciones sobre sus vías metabólicas.¹⁻⁴

Algunas sustancias se unen al receptor para estrógeno y tienen actividad estrogénica, como el DDT, los ftalatos,^{7,8} y el bisfenol A.^{9,10} Otros, por el contrario, impiden la unión del estradiol con su receptor por lo que son antiestrogénicos, como el aldrín, el dieldrín, el endosulfán, la permetrina, algunas dioxinas y furanos. Otro grupo de sustancias, se une al receptor de la testosterona impidiendo su acción y se catalogan como antiandrogénicos. Entre ellos, se encuentran: DDE, kepona, lindano,¹¹ fenitrothión, linurón, permetrina, vinclozolin, algunos ftalatos y bifenilos policlorados. Los fungicidas del grupo de las triazinas, triazoles,¹² y el fenamirol, bloquean la síntesis de estradiol, posiblemente inhibiendo la acción de la aromatasa. Los pesticidas dieldrín, endosulfán, metiocarb y fenamirol actúan como agonistas estrogénicos y antagonistas androgénicos. El clorpirifos, al igual que la deltametrina, el metil-tolclofos y el metil-tribenurón inducen débilmente respuesta en los ensayos de estrogenicidad.¹³

Los ditiocarbamatos Maneb, Mancozeb y Zineb inhiben la síntesis de tiroxina y hay evidencias *in vitro*, de que producen un aumento en la mitosis de las células de la tiroides, por lo cual, se les considera posibles cancerígenos para este órgano. Las concentraciones de T3 y T4 disminuyen también bajo la acción de algunos organofosforados,¹⁴ carbamatos, piretroides y algunos bifenilos policlorados.¹³

Los DE pueden también causar anomalías del desarrollo y la reproducción mediante alguno de los mecanismos siguientes:^{4,15} a) mutaciones que dan lugar a enzimas disfuncionales, b) biotransformación o generación de nuevos compuestos xenobióticos que modifican procesos enzimáticos como la familia citocromo P450, la 5- α -reductasa, las sulfotransferasas y las sulfatasas, entre otras,^{16,17} c) generación de intermediarios o nuevas moléculas con actividad genotóxica o antagónica enzimática, d) generación de microambientes que modifican la susceptibilidad a ciertos agentes tóxicos o a carcinógenos medioambientales y e) exposición directa al carcinógeno ambiental o al metabolito que generan intermediarios activos capaces de ocasionar mutaciones en las células.

ENSAYOS PARA DETERMINAR DISRUPCIÓN ENDOCRINA DEL APARATO REPRODUCTOR

Organismos internacionales han propuesto diversas baterías de pruebas toxicológicas y bioensayos *in vitro* e

in vivo para la identificación de DE.¹⁸ Se pretende sentar las bases para la estimación de la exposición a estas sustancias y como objetivo adicional, que puedan ser instrumentos de regulación en el comercio internacional de productos químicos y sus derivados.¹⁹

A continuación, se describe la metodología de dos ensayos *in vivo* que permiten identificar las sustancias que pueden conducir a una disrupción endocrina del aparato reproductor.

Ensayo uterotrófico

La respuesta uterotrófica ha sido empleada para evaluar la actividad estrogénica en diferentes especies mamíferas, aves y principalmente en roedores. La rata ha sido considerada la especie más utilizada en los estudios toxicológicos y de reproducción. En particular, las ratas hembras inmaduras y las adultas ovariectomizadas (ovx) se utilizan para identificar los potenciales efectos estrogénico y antiestrogénicos *in vivo* de sustancias en que se sospeche dicha acción.²⁰⁻²⁶

Diseño experimental. Para la realización de este ensayo, se utilizan preferentemente ratas Sprague Dawley hembras, línea en la cual se lleva a cabo la mayoría de las pruebas de validación de este ensayo.²³⁻²⁶ También se han empleado otras líneas,²⁰⁻²² e incluso ratones.²⁷

La edad de los animales en el modelo de ratas inmaduras debe ser de 19 a 23 d y el peso debe estar entre 26 y 57 g aproximadamente,^{20-23,25} mientras que en el modelo de ratas adultas ovariectomizadas se utilizan animales de más de seis semanas y de peso corporal mayor de 142 g.²²⁻²⁵

Posterior al período de cuarentena, los animales se distribuyen aleatoriamente en grupos experimentales, de ocho animales por grupo, como mínimo,²³ los que posteriormente, se someten al procedimiento quirúrgico, previamente anestesiados con tiopental o pentobarbital sódico (40 a 60 mg/kg).²⁴

En el modelo de ratas maduras los animales se distribuyen en cuatro grupos, a tres de los cuales se les practica la ovariectomía bilateral. Un grupo se trata por vía oral con el vehículo (control negativo), a otro se le administra estradiol 30 μ g/kg por vía subcutánea (sc.) (control positivo), un tercero se trata con la sustancia a investigar, mientras al cuarto grupo se le realiza toda la manipulación quirúrgica, sin extirpar los ovarios, los cuales son los controles del procedimiento quirúrgico o falsos operados, que se tratan con el vehículo.²⁴ A la semana (como mínimo) de la cirugía, los animales se pesan y se tratan durante 3, 7 ó 14 d.^{23,24,26}

De acuerdo con la experiencia práctica,^{24,27} la correcta cirugía es el primer paso determinante en el éxito del modelo experimental. La remoción de los ovarios ha de ser cuidadosamente realizada para que la ovariectomía sea total; pues pequeñas porciones de ovario remanentes pueden provocar, posteriormente, falsos positivos, debido a la capacidad de generar una actividad estrogénica compensatoria importante, dando al traste con el adecuado funcionamiento del modelo experimental, de ahí, la importancia de que sea realizado por un personal previamente entrenado en este procedimiento quirúrgico.

Estos esquemas de tratamiento están en función del ciclo estral de las ratas (4 a 5 d), por lo que un tratamiento de tres días comprende el tiempo de respuesta de los estrógenos endógenos producidos en el animal intacto,²³ mientras un tratamiento por 14 d abarca un período de tres ciclos estrales.²⁸

El modelo de ratas inmaduras utiliza el mismo número de grupos experimentales y se inicia el tratamiento una vez al día durante tres días, sin que se realice la

ovarectomía.^{22,24,26,27,29} En ambos modelos, pasadas 24 h del último tratamiento los animales se pesan, se anestesian y se desangran hasta morir. Se realiza la disección del útero,²⁰⁻²⁶ el cual se pesa en estado húmedo en balanza analítica para calcular la relación entre su peso y el peso corporal.²⁰⁻²⁶ Los úteros se fijan en formaldehído 10 % estabilizado y los cortes se colorean con hematoxilina y eosina para el análisis histopatológico.^{23,26}

La remoción del útero constituye, sin lugar a dudas, el segundo de los momentos críticos de este ensayo. Su disección ha de realizarse con mucho cuidado y también por personal entrenado en esta técnica, de modo tal que exista una homogeneidad en la eliminación de los tejidos adyacentes y la separación del útero del resto del sistema reproductivo, siempre a nivel del cuello uterino. Especial importancia reviste este momento, determinante según la experiencia de los autores en el ensayo, pues una inadecuada escisión puede provocar la eliminación del líquido contenido en el lumen uterino como consecuencia del proceso edematoso resultante de la acción estrogénica y por tanto, su ocurrencia distorsionaría la cuantificación del efecto observado.

La detección de hiperplasia endometrial (HE) se realiza en todos los animales.²⁰⁻²⁹ Y la frecuencia de casos con HE en los grupos tratados y el control se compara con la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher. La ganancia en peso corporal y del peso relativo y absoluto del útero en animales tratados y controles se comparan con un análisis de varianza (ANOVA).²⁴

La respuesta uterina a agonistas estrogénicos se manifiesta por un incremento del peso de este órgano debido a una combinación de imbibición de agua en el tejido e hipertrofia uterina mediada por la interacción de estrógenos con elevada afinidad con los receptores del tejido uterino.

En resumen, la acción de un agonista estrogénico puede ser identificada por el aumento significativo del peso uterino relativo o absoluto en los animales tratados respecto a los controles, mientras los antagonistas estrogénicos previenen o reducen el aumento del peso del útero cuando es inducido por un agonista.²³

Ensayo de Hershberger

El ensayo de Hershberger es un método *in vivo* para la determinación de disruptores endocrinos potenciales en machos que ha sido validado por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico y que resulta de fácil reproducibilidad.^{20,30,31}

Diseño experimental. Se emplean ratas machos jóvenes de 6 semanas de edad, las cuales, después del período de cuarentena o readaptación son castradas.^{20,30,31} Después de ocho días de recuperación, las ratas se distribuyen aleatoriamente en grupos experimentales (seis ratas por grupo).^{20,30,31} Un grupo control negativo se trata con el vehículo, un control positivo se trata con propionato de testosterona (PT) (0,2 ó 0,4 mg/kg) (control positivo), otro grupo se trata con la sustancia de ensayo, otro con la sustancia de ensayo + PT y finalmente, otro grupo (si el investigador lo considera necesario) se administra con PT y un antagonista androgénico que puede ser la flutamida,^{30,32} el vinclozolin (VCZ), el 2,2-bis(4-clorofenil)-1,1-dicloroetileno (*p,p'*-DDE),³¹ o el Finasteride.²⁹

Los animales deben ser administrados diariamente por 10 d, aproximadamente a la misma hora.³¹ Después de 24 h del último tratamiento, los animales se pesan y sacrifican por métodos eutanasícos y posteriormente, se desangran. Durante la necropsia se extraen y pesan los tejidos siguientes: glándulas de Cowper, músculo bulbo

cavernoso elevador del ano (BC/EA), vesículas seminales, próstata ventral y glándulas prepuciales, estos cinco órganos y tejidos sexuales secundarios son los indicadores de la acción androgénica. Además, se pesan los órganos siguientes: hígado, riñones y glándulas adrenales.^{20,31} Es muy importante realizar la disección del tejido adiposo de los tejidos extraídos de forma cuidadosa y uniforme en todas las muestras.³¹ Se calcula la relación entre el peso de los tejidos y el corporal.

El grupo de trabajo de los autores ha utilizado este ensayo en dos ocasiones (trabajos aún no publicados), previo entrenamiento en la ubicación y disección de cada uno de los órganos y tejidos diana de este modelo y se ha comprobado sin lugar a dudas, que el entrenamiento previo es primordial para la obtención de resultados confiables. Asimismo, sobre la base de la experiencia práctica, se sugiere que sea realizado por un equipo de dos o tres integrantes, en el que cada cual se especialice en la extracción de determinados órganos y tejidos en particular, con lo que se logra disminuir el tiempo de la autopsia y a su vez, resulta vital para evitar la desecación de órganos y tejidos, lo cual introduciría distorsión de los resultados y además una muy importante falta de homogeneidad en la disección de cada órgano y tejido a estudiar, de particular importancia en el caso de las vesículas seminales, la próstata ventral y el músculo bulbo cavernoso elevador del ano, quienes exigen una experticia mayor que el resto para una adecuada extracción.

El ensayo Hershberger (10 d) resulta fiable para evaluar las concentraciones de hormonas tiroideas como la tiroxina (T4), triyodotironina, (T3) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH), y también de la foliculo estimulante (FSH) y testosterona (T) en ratas castradas tratadas con propionato de testosterona (PT). Para ello, se emplean los moduladores tiroideos siguientes: un inhibidor de la tiroperoxidasa, propiltiouracilo (PTU), y dos inductores que refuerzan la acción de las hormonas tiroideas, fenobarbital (PB) y 2,2-bis(4-clorofenil)-1,1-dicloroetileno (*p,p'*-DDE).³³⁻³⁵

La respuesta de las glándulas de Cowper, BC/EA, vesículas seminales, próstata ventral y glándulas prepuciales a los agonistas androgénicos se traduce en un aumento de su peso debido a la interacción de andrógenos con elevada afinidad con los receptores que presentan. Sin embargo, el músculo bulbocavernoso elevador del ano responde a la presencia de andrógenos diferente al resto de los órganos y tejidos debido a que él carece de la enzima 5 α -reductasa, a diferencia de los otros tejidos.²⁰ Por tanto, la acción de un agonista androgénico puede ser identificada por el aumento significativo del peso de estos órganos y tejidos en los animales tratados respecto a los controles, mientras los antagonistas androgénicos se identifican por prevenir o reducir el aumento del peso de estos órganos y tejidos cuando son administrados simultáneamente un agonista y un antagonista.^{20,31}

CONCLUSIONES

El ensayo uterotrófico resulta de mucha utilidad para determinar si una sustancia presenta la capacidad de alterar la funcionalidad hormonal del aparato reproductor femenino, cuantificado a través de una variación en el peso del útero. Mientras que el ensayo de Hershberger resulta también de igual interés, pero en el caso del aparato reproductor masculino y su expresión se mide mediante la variación del peso de: la próstata, las vesículas seminales, las glándulas de Cowper, el músculo bulbo cavernoso retractor del ano y las glándulas prepuciales.

Ambos son ensayos de fácil realización, sensibilidad y reproducibilidad, así como económicamente factibles, por lo que son de gran utilidad dentro de la batería de ensayos toxicológicos de rutina a realizar en la evaluación toxicológica de nuevas sustancias, máxime en aquellas que por su modo de acción pudieran provocar disrupción endocrina del aparato reproductor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Damstra T., Barlow S., Bergman A., Kavlock R. And Van Der Kraak G. Evaluación Global del Estado de la Ciencia sobre Disruptores Endocrinos. Programa internacional de seguridad química AAMMA, Argentina, 2003.
- Environmental Protection Agency. Endocrine Disruptor Screening Program; Chemical Selection Approach for Initial Round of Screening. **Federal Register**, **70**, 56449, 2005.
- Olea N., Fernández M.F., Araque P. y Olea-Serrano F. Perspectivas en disrupción endocrina, **Gaceta Sanitaria**, **16**, 250, 2002.
- González A. y Alfaro J.M. Nuevos disruptores endocrinos: Su importancia en la población Pediátrica. **IATREIA**, **18**, 446, 2005.
- Allera A., Lo S., King I., Steglich F. and Klimmuller D. Impact of androgenic/antiandrogenic compound (AAC) on human sex steroid metabolizing key enzymes. **Toxicology**, **205**, 75, 2004.
- Coelho A.J. Endocrine disruptors and dental materials: health implications associated with their use in Brazil. **Cad Saude Publica**, **18**, 505, 2002.
- Zhang Y., Ge R. and Hardy M. Androgen-forming stem Leydig cells: identification, function and therapeutic potential. **Dis. Markers**, **24**, 277, 2008.
- Culty M., Thuillier R., Li W., Wang Y., Martinez-Arguelles D., Benjamin C., Triantafyllou K., Zirkin B. and Papadopoulos V. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate exerts both short-term and long-lasting suppressive effects on testosterone production in the rat. **Biol. Reprod.**, **78**, 1018, 2008.
- Bjerregaard L., Lindholm C., Korsgaard B. and Bjerregaard P. Sex hormone concentrations and gonad histology in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to 17 β -estradiol and bisphenol A. **Ecotoxicology**, **17**, 252, 2008.
- Bonefeld-Jørgensen E., Long M., Hofmeister M. and Vinggaard A. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol *in vitro*: new data and a brief review. **Environ Health Perspect**, **115**, 69, 2007.
- Sauviat M. y Pages N. Cardiotoxicity of lindane, a gamma isomer of hexachlorocyclohexane. **J. Soc. Biol.**, **196**, 339, 2002.
- Taxvig C., Vinggaard A., Hass U., Axelstad M., Metzdorff S. and Nellemann C. Endocrine-disrupting properties *in vivo* of widely used azole fungicides. **Int. J. Androl.**, **31**, 170, 2008.
- Morales C. y Rodríguez N. El Clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche. **Rev. Col. Cienc. Pec.**, **17**, 256, 2004.
- Moustafa G., Ibrahim Z., Ahmed M., Ghoneim M., Sakamoto K., Ishizuka M. and Fujita S. Downregulation of male-specific cytochrome P450 by profenofos. **Jpn J Vet Res**, **56**, 109, 2008.
- Lackey B.R., Gray S.L. and Henricks D.M. Crosstalk and considerations in endocrine disruptor research. **Journal Medical Hypotheses**, **56**, 644, 2001.
- Fisher J.S. Are all EDC effects mediated via steroid hormone receptors? **Toxicology**, **205**, 33, 2004.
- Jacobs M.N. and Lewis D.F. Steroid hormone receptors and dietary ligands: a selected review. **Proc. Nutr. Soc.**, **61**, 105, 2002.
- Organization for Economic Cooperation and Development. Appraisal of test methods for sex-hormone-disrupting chemicals. Paris: OECD Environmental Health and Safety Publications, Environment Directorate, 1997.
- Rice C., Birnbaum L. S., Coglian J., Mahaffey K., Needham L., Rogan W. J. and Vom Saal F.S. Exposure Assessment for Endocrine Disruptors: Some Considerations in the Design of Studies. Mini-Monograph. **Environmental Health Perspectives**, **111**, 1683, 2003.
- Ashby J., Tinwell H., Odum J., and Lefevre P. Natural Variability and de influence of concurrent Control Values on the detection and interpretation of low- dose or weak endocrine toxicities. **Environmental Health Perspectives**, **112**, 847, 2004.
- Ashby J., Tinwell H., Soames A. and Foster J. Induction of Hyperplasia and Increased DNA Content in the Uterus of Immature Rat Exposed to Caumestrol. **Environmental Health Perspectives**, **107**, 819, 1999.
- Tinwell H., Soames A.R., Foster J.R. and Ashby J. Estradiol-Type activity of coumestrol in mature and immature ovariectomized rat uterotrophic assays. **Environmental Health Perspectives**, **108**, 631, 2000.
- Kanno J., Onyon L., Haseman J., Fenner-Crisp P., Ashby J. and Owens W. The OECD Program to Validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. **Environmental Health Perspectives**, **109**, 785, 2001.
- Pardo B., Gutiérrez A., Gámez R., Mas R., Mendoza S., Noa M., et al. Estudio de los posibles efectos estrogénicos del D-004. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, **38**, 103, 2007.
- Tinwell H., Ashby J. Sensitivity of the Immature Rat Uterotrophic mixtures of Estrogens. **Environ. Health. Perspectives**, **109**, 569, 2004.
- Kanno J., Onyon L., Peddada S., Ashby J., Jacob E. and Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic. Bioassay Phase 2: Coded single-dose studies. **Environ. Health. Perspectives**, **111**, 12, 2003.
- Noa M., Mendoza S., Mas R., Gámez R., Valle M., Pardo B., Gutiérrez A. and Mendoza N. D-003 does not possess oestrogenic potencial *in vivo*: findings of uterotrophic assay. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **59**, 1433, 2007.
- Markey C., Michaelson C., Veson E., Sonnenschein C. and Soto A. The Mouse Uterotrophic Assay: A Reevaluation of its Vality in Assasing the Estrogenic of Bifenol A. **Environ. Health. Perspectives**, **109**, 55, 2001.
- Semler D., Cox S.G. and Chengelis C.P., Animals Models in Toxicology, Chapter II, **Drug and Chemicals Toxicology**, 21, 1992.
- Organization for Economic Cooperation and Development. Third Meeting of the OECD Validation Management group (VMG) for the Screening and Testing of Endocrine Disrupters. Paris, 2001.
- Yamasaki K., Sawaki M., Ohta R., Okuda H., Katayama S., Yamada T., Ohta T., Kosaka T. and Owens W. OECD Validation or the Hershberger Assay in Japan: Phase 2 Response of Methyl testosterone, Viciozolin and γ -DDE. **Environmental Health Perspectives**, **111**, 1912, 2003.
- Anahara R., Toyama Y. and Mori C. Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. **Reprod. Toxicol.**, **25**, 139, 2008.
- Environmental Protection Agency. Workshop report: Screening methods for chemicals that alter thyroid hormone action, function and homeostasis. 1997.
- Christian M. and Trenton N. Evaluation of thyroid function in neonatal and adult rats: The neglected endocrine mode of action. **Pure Appl. Chem.**, **75**, 2055, 2003.
- Yamada T., Kunimatsu T., Miyata K., Yabushita S., Sukata T., Kawamura S., Seki T., Okuno Y. and Mikami N. Enhanced Rat Hershberger Assay Appears Reliable for Detection of Not Only Antiandrogenic Chemicals but Also Thyroid Hormone Modulators. **Toxicological Sciences**, **79**, 64, 2004.