



El Clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche



Carlos A Morales¹, MV.; Nérida Rodríguez¹, MV MS.

¹Grupo de Investigación Centauro, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia. carlosarmo@epm.net.co

(Recibido: 2 marzo, 2004; aceptado: 1 septiembre, 2004)

Resumen

La presente revisión se inicia con una descripción del estado actual del uso de insecticidas en la producción agropecuaria, con énfasis en organofosforados, suministrando datos sobre la situación en Colombia. El artículo realiza un examen sobre información actualizada acerca del papel de los disruptores en general, sus acciones y los mecanismos de acción hasta ahora descubiertos. Dentro de los organofosforados se destaca el Clorpirifos, pesticida del cual se conoce su acción como disruptor endocrino afectando principalmente las hormonas tiroideas, y con resultados contradictorios con respecto a los estrógenos; se deduce de la revisión, la escasa información disponible a nivel mundial sobre los DE en bovinos, al compararla con la que existe para otras especies, especialmente las silvestres. Se concluye con la necesidad de ahondar en la búsqueda del posible papel del Clorpirifos como disruptor hormonal en ganado en la región lechera del Norte de Antioquia, Colombia, teniendo en cuenta el volumen y las prácticas de utilización del mismo, identificando las relaciones potenciales entre sus niveles residuales en leche y los niveles plasmáticos de las hormonas tiroideas y los estrógenos, mediante la utilización de modelos experimentales in vivo, con animales en producción, que refuerzan a su vez la incursión en la utilización posterior o concomitante de modelos in vitro.

Palabras clave: organofosforados, pesticidas, tiroxina.

Introducción

A pesar de haber sido retirados del mercado varios de los plaguicidas más tóxicos y del auge relativo que en los últimos años ha tenido la llamada “agricultura orgánica” o “agricultura limpia”, la producción agropecuaria mundial depende aún en alta proporción del uso de plaguicidas con el fin de controlar insectos, hongos o plantas que afectan negativamente o compiten con los animales y los cultivos. La utilización de estas sustancias químicas ha permitido un notable incremento en el rendimiento y la producción agrícola y pecuaria, pero el precio que la salud humana y ambiental han pagado, debe ser considerado antes de continuar con su uso indiscriminado.

En 1971, la Federación Internacional de Lechería consultó a los expertos sobre la identidad de los compuestos más peligrosos, encontrando que prevaleció el contenido de los plaguicidas organoclorados en leche y sus derivados (21).

Alpuche en 1991, reporta que hasta ese año, y durante los últimos 25, se habían aplicado unos 20.000 millones de libras de insecticidas sobre el planeta, de los cuales tres mil millones habían sido de DDT (diclorodifenil-tricloroetano) (2). Actualmente ha disminuido la utilización de organoclorados gracias a las directrices legislativas de muchos países; Canadá

prohibió el uso del DDT desde 1969, Suecia en 1970; España en 1977 y Turquía lo restringió en 1983 (21).

En Colombia el DDT se prohibió definitivamente en 1986; el Dieldrín, el Aldrín y el Heptacloro en 1987. El Lindano y el Clordano se permitieron hasta 1992 y el último de los organoclorados en ser prohibido en Colombia fue el Endosulfán, cuyo uso se permitió para el control de la broca del café hasta el año 2001 (34). A pesar de lo anterior, es muy posible que sus residuos y los de sus metabolitos estén todavía presentes en los animales y humanos (44). En el 2001 se encontraron residuos de Aldrin, Lindano y Heptaclor en leches esterilizadas en Buenos Aires, Argentina, a pesar de haber sido prohibido su uso, más de 10 años atrás (57).

El número de víctimas humanas y animales por intoxicación aguda con plaguicidas es alarmante y debería ser, por sí solo, una razón para la búsqueda de alternativas en el control de las plagas. Sin embargo, los efectos de exposiciones a bajas dosis durante largos períodos de tiempo son aún más preocupantes y apenas se están estudiando desde hace dos décadas (11).

Los pesticidas y otras sustancias químicas como los bifenilos policlorados, están siendo investigados por su acción como disruptores endocrinos (DE) ya que afectan significativamente el equilibrio hormonal de los animales. Los disruptores endocrinos son sustancias que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas responsables del metabolismo, la reproducción, el desarrollo y el comportamiento. Muchas de ellas son lipofílicas y presentan en diferente medida, propiedades de bioacumulación y biomagnificación, por lo que se depositan en el organismo sometiéndolo a una exposición crónica (43).

Muchas de estas sustancias utilizadas para el control de plagas que afectan a los animales o a los alimentos que estos consumen, como es el caso de los pastos, pasan a los seres humanos a través de la leche, constituyéndose en un problema de salud pública. Se estima que en los Estados Unidos el 35 por ciento de los alimentos consumidos tienen residuos de uno o varios de los 600 plaguicidas en uso, pero los métodos de análisis usados sólo detectan un tercio de ellos (52).

Diversos estudios señalan que la principal fuente de disruptores endocrinos en la dieta humana, son

los productos contaminados de origen animal como leche, mantequilla, queso, carne y huevos. Este es el reflejo de los altos niveles de pesticidas que se usan en la producción agropecuaria, con el agravante de que muchos de ellos se acumulan en el tejido adiposo de los animales, afectando no sólo a estos últimos sino también a su progenie y a los humanos (17, 57, 67).

Los residuos y contaminantes presentes en la leche incluyen los grupos de pesticidas, antibióticos, sulfonamidas, nitrofuranos, fasciolidas, metales pesados, micotoxinas, bifenilos policlorados, dibenzo-p-dioxinas, dibenzofuranos policlorados, nitratos, nitritos, nitrosaminas, detergentes y desinfectantes (23)

En Colombia los plaguicidas más utilizados actualmente en la producción agropecuaria, son los organofosforados, los carbamatos y los piretroides (13, 42). Aunque la bioacumulación de éstos es baja, ya se tiene evidencia de sus efectos como disruptores endocrinos sobre la glándula tiroidea y las gónadas (51, 71).

Un estudio realizado en Antioquia, Colombia, por el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, durante un período de 3 años estableció que el insecticida más usado en las zonas lecheras del Altiplano Norte y del Oriente de este Departamento para el control de los insectos depredadores del pasto, especialmente *Collaria spp*, es el Clorpirifos (42).

El Clorpirifos es un insecticida organofosforado cuyos residuos han sido asociados con una disminución en los niveles de la Hormona Tiroxina (T_4) y con un aumento en los niveles del Estradiol en ovejas (61). Se ha asociado además con bajo peso al momento del nacimiento y menor circunferencia craneal en niños cuyas madres fueron expuestas en forma crónica al pesticida (55).

Las consecuencias que los disruptores endocrinos tienen en la fisiología reproductiva de los bovinos, ha cobrado gran interés apenas en los últimos años, motivado por el nivel de exposición de los animales a estas sustancias.

De lo anterior, se deduce la necesidad de crear programas que permitan, además de determinar los niveles de residuos de plaguicidas, monitorear las concentraciones hormonales en los animales expuestos.

Para el caso de los mencionados residuos, en Colombia el “Convenio de Competitividad de la Cadena Láctea y sus Derivados”, se ha fijado como una de sus metas el apoyar la conformación de una red de laboratorios de referencia y su acreditación, con miras al control de la calidad de la leche y sus derivados, tarea que incluye la vigilancia de los potenciales residuos y contaminantes presentes en estos productos (14). Este aspecto desde luego es clave para enfrentar los retos que implica la apertura de mercados externos.

Insecticidas fosforados orgánicos (organofosforados)

Los insecticidas fosforados orgánicos se agrupan, junto a los Carbamatos, dentro de los denominados Inhibidores de Colinesterasa. Arbusow sintetizó el primer fosfato y fosfonato en 1906. Balereff preparó el primer éster del ácido fosfórico en 1914. Gerhar Schrader *et al* realizaron estudios sobre el tema en Alemania, encontrando en sus investigaciones el aspecto más importante en la aplicación de estos productos: la acción insecticida “sistémica” ejercida en animales y en vegetales. El primer compuesto producido en forma industrial fue el Bladan o TEPP (Tetraetilpirofosfato) que fue usado por primera vez como insecticida en Alemania (15).

Los organofosforados inhiben la acetilcolinesterasa y ejercen su acción al causar acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis mediadas por éste (15,16). De esta forma actúan tanto en los insectos como en los mamíferos (15).

Con respecto a la acción neurotóxica de estos pesticidas, se ha comprobado que cuando las hembras preñadas se exponen a pesticidas organofosforados, al igual que a carbamatos, estos producen una mayor inhibición de la colinesterasa en los fetos que en la madre (67).

El mayor uso de los organofosforados está asociado a la actividad agrícola (15,54) y hasta el momento son capaces de combatir plagas que otros insecticidas no han logrado, permitiendo entonces predecir que su persistencia en el mercado mundial durará por tiempo indefinido, hasta obtener otras sustancias químicas que garanticen este propósito (15). Estos plaguicidas son poco persistentes, lo que implica que sea necesario aplicarlos con más frecuencia para lograr una acción eficiente (23).

Según la División de Insumos Agrícolas del Instituto Colombiano Agropecuario, en 1999 se vendieron cerca de 8 millones de litros y aproximadamente 5.7 toneladas de insecticidas, de los cuales aproximadamente 4 millones de litros, y 4.5 toneladas, correspondieron a organofosforados (13).

En el aspecto toxicológico y de salud pública, los insecticidas organofosforados son los principales responsables de intoxicaciones agudas en países en vía de desarrollo (23). En China causan el 78.8% de dichas intoxicaciones, en Sri Lanka 69.1% y 53.6% en Malasia (31). La OMS ha reportado alrededor de tres millones de envenenamientos agudos por año, de los cuales 220.000 son mortales, siendo los países en desarrollo los más afectados, con un 99% de los casos. En Latinoamérica la mayoría de los casos responde a actividades ocupacionales (23). Esto último es facilitado por cuanto los organofosforados se absorben por todas las vías: oral, dérmica, conjuntival, parenteral, rectal e inhalatoria (15).

El Clorpirifos: toxicología e impacto ambiental

El Clorpirifos es un insecticida organofosforado, clasificado entre los productos de Clase II (moderadamente peligroso). Su nombre según la nomenclatura IUPAC es 0,0-dietil 0-(3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato) y su fórmula empírica es $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (64).

Este producto fue registrado por primera vez en los Estados Unidos de América en 1965. En los últimos años, en el mercado mundial se han usado alrededor de 800 productos registrados cuya formulación lleva Clorpirifos. Aproximadamente 21 a 24 millones de libras americanas son usadas en los Estados Unidos, de las cuales aproximadamente 11 millones son aplicadas en sitios no agrícolas, y de estos últimos, según Dow AgroSciences (DAS), en 1998, un 70% se aplicó para el control de las termitas (64).

En los Estados Unidos, el Clorpirifos fue permitido para uso residencial hasta el año 2000 cuando fue restringido por la United States Environmental Protection Agency (US EPA) (59).

En 1999, en Colombia fueron vendidos alrededor de 2.100.000 litros y 1.6 toneladas de Clorpirifos, siendo este el organofosforado con mayor participación porcentual respecto al total de ventas de este grupo de insecticidas (13).

El Clorpirifos es usado en forma de fosforotioato, el cual es un inhibidor débil de la acetilcolinesterasa. Esta forma es convertida *in vivo* desde la forma azufrada (P=S) a un éster fosfato activo u oxón (P=O), que posee una fuerte acción sobre la colinesterasa. En el caso del humano adulto esta transformación ocurre en el hígado, mediada especialmente por la enzima CYP3A4, la principal isoforma del citocromo P450 (CYP) (16).

La principal ruta de excreción en humanos, ratas y cabras es a través de la orina. Los humanos excretan aproximadamente el 70% de una dosis oral de Clorpirifos por esta vía (50) y las ratas un 90% (67). En humanos se ha encontrado una vida media de eliminación del Clorpirifos de 26.9 horas (10).

El Clorpirifos es rápidamente convertido a 3,5,6 tricloro 2-piridinol en humanos, ratas y cabras (10,64). En trabajos de campo en humanos se ha utilizado este metabolito en orina como un marcador del nivel de ingestión del pesticida (59). Las concentraciones más altas en los tejidos son halladas en hígado y riñón, aunque el Clorpirifos no se acumula en los tejidos. Menos de 0.1 % de de la dosis administrada a cabras fue encontrada en la leche (10).

La evaluación experimental de la toxicidad aguda del Clorpirifos muestra una LD₅₀ oral en ratas con un rango entre 69 y 276 mg/kg (24). En conejos la LD₅₀ dérmica es mayor a 2330 mg/kg. y en estos mismos la irritación dérmica por exposiciones prolongadas fue moderada. En cobayos no se encontró reacción de sensibilización alérgica (19).

Los principales efectos subcrónicos del Clorpirifos observados, fueron signos colinérgicos y depresión de la actividad de las colinesterasas en plasma y glóbulos rojos. En perros el NOEL (no-observed-effect level) a 90 días fue de 1.8mg/kg./día para los signos colinérgicos. El NOEL subcrónico para la inhibición de las colinesterasas sanguínea y de glóbulos rojos en ratas fue de 1 mg/kg./día. En un estudio de farmacocinética en humanos no se observaron signos colinérgicos a dosis de 0.5 mg/kg., aunque el nivel de colinesterasa fue deprimido en un 85% (50). El NOEL subcrónico para la actividad de colinesterasa en plasma de humanos fue de 0.03 mg/kg./día (10).

Respecto a la toxicidad crónica del Clorpirifos, se encontró un NOEL oral para la depresión de la actividad de la colinesterasa a nivel del cerebro de 1

mg/kg./día para ratas en estudios a dos años y el mismo nivel para estudios a un año en perros (10).

El NOEL para la inhibición de la colinesterasa de glóbulos rojos fue de 0.1 mg/kg./día en ratas y 0.03 mg/kg./día en perros; el NOEL para la inhibición de la actividad de colinesterasa plasmática fue de 0.05 mg/kg./día en ratas y 0.01 mg/kg./día en perros (10).

El Clorpirifos suministrado por vía oral no ha mostrado efectos oncogénicos ni en ratas ni en ratones (10,64). Las pruebas realizadas hasta el momento no indicaron efectos mutagénicos (19). Estudios de mutagenicidad en bacterias y células ováricas de hámster fueron negativos (10).

No obstante lo anterior; un estudio de 1995 lo asocia con un síndrome de malformaciones en niños cuyas madres fueron expuestas al insecticida en la primera etapa de la gestación (61).

En estudios para evaluar el impacto ambiental del Clorpirifos, se encontró que una dosis de 0.3 µg/l es extremadamente tóxica para la trucha, mientras que en la codorniz la LD₅₀ en el alimento es de 423 mg/kg. La persistencia en el suelo del Clorpirifos a 35°C es de 68 días (19).

Un comité de expertos sobre residuos de pesticidas de la FAO-OMS recomendó en 1982 un límite máximo de residuos de Clorpirifos en leche de 0.01 mg/kg. Debido a las evidencias de su posible disrupción hormonal, este insecticida se encuentra en la Lista Prioritaria para Reevaluación de Límites Máximos de Residuos (22).

Los disruptores endocrinos (DE)

Los disruptores endocrinos (DE) son compuestos químicos contaminantes ambientales, que una vez incorporados a un organismo, pueden afectar significativamente su equilibrio hormonal. La US EPA, los define como "agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales responsables del metabolismo, la reproducción, el desarrollo y el comportamiento" (20).

El conocimiento sobre la acción y efectos de estas sustancias químicas sobre el sistema endocrino es relativamente reciente. En 1970 se asoció al DDT (1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano) y a su

metabolito DDE (1,1-bis-(4-clorofenil) -2,2- dicloro- eteno) con una drástica caída en la población de pájaros piscívoros en los Grandes Lagos de Norte América, aunque aún no se conocía su mecanismo de acción (11).

En 1992 se publicaron los resultados de un estudio retrospectivo de 50 años sobre la concentración espermática en hombre sanos de diferentes edades en Europa. Se encontró que entre 1940 y 1990, la cantidad media de espermatozoides había descendido en un 50%, al mismo tiempo que había aumentado el porcentaje de espermatozoides con problemas de motilidad y morfología. Además, se triplicó la incidencia de criptorquidia e hipospadias en niños. El estudio finalmente relacionó estos hallazgos, con la contaminación por bifenilos policlorados, pesticidas y otras sustancias químicas en esas zonas de Europa (8).

Más adelante, se demostró que además de las sustancias ya conocidas como disruptores endocrinos (bifenilos policlorados), algunos aditivos de los plásticos transparentes como nonilfenol y bisfenol, también tenían actividad hormonal *in vitro* (11).

En 1996, el Acta de Protección de la Calidad de los Alimentos (Food Quality Protection Act, FQPA) solicitó a la US EPA, a través de su Oficina de Pesticidas, desarrollar un programa para determinar si ciertas sustancias (incluidos los pesticidas) podrían tener efectos estrogénicos, o en general endocrinos, sobre la salud humana. La US EPA propuso el Programa de Evaluación de Disruptores Endocrinos, el cual fue publicado en 1998 (64)

Aunque los pesticidas en general no se encuentren en altas concentraciones en el medio ambiente, la biodisponibilidad de muchos de ellos se ve aumentada debido a que son lipofílicos y se resisten al metabolismo, acumulándose por largo tiempo en los tejidos de los animales (60).

Actualmente más de 500 compuestos químicos son considerados DE. De algunos de ellos se tiene evidencia de su actividad disruptiva hormonal *in vivo*, mientras que de otros sólo se ha investigado su acción *in vitro* (20). En la tabla 1 se observan, clasificados, algunos de los principales DE.

Tabla 1: Sustancias químicas catalogadas como disruptores endocrinos*

Pesticidas	Químicos industriales o comerciales
Pesticidas organoclorados: DDT, dieldrín, clordano, endosulfán, lindano, metoxicloro y toxafeno (40, 43,51)	Bifenilos policlorados (PCBs): Residuos de la producción de cloro, PVC, lubricantes, refrigerantes y aceites industriales (5, 20, 38).
Pesticidas organofosforados: Malatión, paratión, clorpirifos, fentiión, metamidofós, dimetoato (1, 30,43)	Dioxinas y dibenzofuranos: Lubricantes, refrigerantes y aceites industriales. Procesos de incineración (39,71)
Carbamatos Aldicarb, carbaryl, carbofurán, (37,51,56)	Ftalatos: Aditivos del plástico poliestireno, industria de PVC detergentes industriales, surfactantes y agentes tensoactivos (6,12,20)
Ditiocarbamatos Mancozeb, maneb, zineb (33,43,51)	Monómeros de plásticos policarbonatos: P-nonilfenol, Bisfenol-A, y otros aditivos (6,39,71)
Piretroides sintéticos Lambdacialotrina, permetrina, cypermetrina (9,27,48)	Metales pesados: Arsénico, cadmio, plomo, mercurio (52,71)

* Resumen según Morales C y Rodríguez N, 2003

Efectos de los DE

Los efectos de los DE varían entre especies y son específicos para cada sustancia química. La severidad de los efectos de los disruptores endocrinos varía según actúen sobre el embrión, el feto, el animal joven o el adulto. Los efectos se manifiestan con mayor

frecuencia en las crías que han sido expuestas *in útero* y durante la lactancia y muchas manifestaciones no se hacen evidentes sino hasta la madurez. (60)

Los efectos en los animales expuestos a disruptores endocrinos durante la edad adulta son sutiles, pero algunos estudios los han establecido. Recientemente,

un estudio demostró una asociación entre la exposición a disruptores endocrinos por contaminación del agua y un aumento en los problemas reproductivos en bovinos (25).

Una revisión general de la acción de los disruptores endocrinos en diferentes especies, nos muestra, entre otros efectos, alteraciones reproductivas en hembras (anestros persistentes, celos silentes, abortos) (67). Aumento en la incidencia de alteraciones en el desarrollo del sistema reproductor en machos de diferentes especies (microfalo, criptorquidia, hipospadias, hipertrofia prostática) (11, 29). Pubertad precoz en hembras (9). Disminución de la fecundidad en aves, peces, moluscos y mamíferos. Disminución de la eficacia en el proceso de incubación en peces, aves y tortugas. Feminización de machos en peces, aves y mamíferos (11, 52, 60). Disminución del volumen seminal y concentración espermática (4, 8, 29).

En el caso de humanos, se han asociado a anomalías espermáticas (4, 8, 35) al igual que al aumento en la incidencia y precocidad de neoplasias y trastornos dependientes de hormonas (cáncer de mama, ovario, útero, vagina, próstata y testículo; endometriosis) (30,69). Se han visto también alteraciones de la función tiroidea en peces, aves, y mamíferos. (1, 56, 58).

Un estudio realizado por Zaidi *et al*, publicado en el año 2000, encontró aumentos en los niveles de TSH y disminución en los niveles de T_3 en operarios encargados de la aplicación de pesticidas, expuestos a presentaciones en polvo y líquidas de Endosulfán, Quinalfos, Clorpirifos, Monocrotofos, Lindano, Parathión, Forato y Fenvalerato (72).

Adicionalmente, se han reportado alteraciones en el desarrollo cerebral, que llevan a trastornos del comportamiento (11, 70). La disrupción en los niveles de los estrógenos y T_4 parecen ser los responsables de las alteraciones en el desarrollo del cerebro en los animales expuestos durante la etapa fetal y en la lactancia (70).

Rawlings *et al*, 1998, en un estudio experimental, en el cual suministraron a ovejas Clorpirifos, encontraron una marcada disminución en los niveles de la hormona tiroxina. Durante este periodo no se notó ningún signo de toxicidad ni de enfermedad en los animales expuestos. En el mismo estudio se encontró un aumento significativo en las concentraciones séricas de cortisol por el suministro de Clorpirifos y Trifluralín.

El estudio sugiere que varios de los pesticidas de uso corriente en la actualidad podrían influenciar las concentraciones séricas de hormonas reproductivas y metabólicas, particularmente tiroxina, el principal producto de secreción de la tiroides e importante regulador del metabolismo (58).

Mecanismos de acción de los DE

Hasta el momento se han identificado diversos mecanismos por los cuales estas sustancias interfieren con la acción de las hormonas.

Algunas se unen al receptor para estrógeno y tienen actividad estrogénica, como el DDT, los Ftalatos y el Bisfenol A. 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 (9, 27, 37).

Otro grupo de sustancias, se une al receptor de la testosterona impidiendo su acción. Estos se catalogan como antiandrogénicos y entre ellos están el DDE, kepona, lindano, fenitrothión, linurón, pemetrina, vinclozolin, algunos ftalatos y bifenilos policlorados (36, 68).

Los fungicidas del grupo de las Triazinas y Triazoles, y el Fenamirol bloquean la síntesis de estradiol, posiblemente inhibiendo la acción de la aromataza y potenciando de esta forma la acción de la testosterona, por lo que producen finalmente una acción androgénica (45).

En una investigación llevada a cabo en Dinamarca, Andersen *et al*, en el 2002, evaluaron 24 pesticidas para la interacción con los receptores de estrógeno (ER) y andrógeno (AR) en ensayos de transactivación. Así mismo, este estudio evaluó los efectos estrogénicos sobre la proliferación de células MCF-7 y los efectos sobre la actividad aromataza CYP-19 en microsomas de placenta humana. Dentro de los pesticidas evaluados se hallaba el Clorpirifos. Los pesticidas Dieldrín, Endosulfán, Metiocarb y Fenamirol actuaron como agonistas estrogénicos y antagonistas androgénicos. El Clorpirifos, al igual que la Deltametrina, el Metil-tolclofos y el Metil-tribenurón indujeron débil respuesta en los ensayos de estrogénicidad. Estos investigadores afirman que aunque la potencia de los pesticidas para reaccionar como agonistas o antagonistas es baja comparada con los ligandos naturales, la respuesta integrada en el

organismo podría ser amplificada por la habilidad de los pesticidas de actuar por varios mecanismos y la exposición frecuente a varios pesticidas simultáneamente (3).

Otros disruptores inhiben las enzimas sulfotransferasas que inactivan los esteroides, disminuyendo la tasa de eliminación metabólica de éstos. La Dioxina 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) actúa en las células de la granulosa, inhibiendo la expresión del gen COX-2 que codifica para la enzima ciclooxigenasa-2 responsable de la ovulación (47).

Algunas sustancias afectan los niveles de las hormonas tiroideas y de la tirotrópina (TSH). Los Ditiocabamatos 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 los considera posibles cancerígenos para este órgano (1).

Los niveles de T₃ y T₄ disminuyen también bajo la acción de algunos organofosforados, carbamatos, piretroides y algunos bifenilos policlorados (1, 33, 62).

La producción, secreción y acción de otras hormonas también se ven afectadas por los disruptores endocrinos, pero su estudio se ha realizado en menor proporción. Tal es el caso del factor liberador de corticotropina (CRF), cuya síntesis y liberación aumentaron en un estudio *in vitro* en presencia de los insecticidas organofosforados, metamidofós y acefato (63).

En un estudio *in vitro* utilizando células hipotalámicas GT1-7 los pesticidas Metoxicloro y Clorpirifos mostraron efectos significativos sobre la transcripción de genes para GnRH y sobre los niveles de ARNm para GnRH. Estos efectos no fueron bloqueados por ICI 182,780 (ICI), un antagonista del receptor de estrógenos (ER), de donde se deduce un mecanismo independiente de este receptor. Este estudio concluyó que Metoxicloro y Clorpirifos alteran la biosíntesis de GnRH en esta línea celular *in vitro*, sugiriendo que ellos podrían tener efectos disruptivos sobre las neuronas productoras de GnRH *in vivo* (28).

Problemática del uso del Clorpirifos en la producción lechera en Antioquia, Colombia

Como se observa en la tabla 1, pesticidas de todos los grupos comercializados actualmente en el mundo,

están siendo investigados por su acción sobre el sistema endocrino.

Nakagawa *et al* (49), realizaron en 1995 una investigación para detectar residuos de pesticidas organoclorados y organofosforados en la leche y en otros productos alimenticios en el Japón, encontrando residuos de pesticidas organoclorados cuyo uso se había suspendido hace varios años y de los organofosforados Malatión y Clorpirifos.

Actualmente, en el mercado colombiano, se comercializan más de 1000 productos usados como pesticidas (herbicidas, fungicidas, insecticidas, acaricidas, nematocidas); en el grupo de los insecticidas se destaca en primer lugar el uso de los organofosforados (13, 42).

Los pesticidas más usados en la producción agropecuaria en Antioquia son el Clorpirifos, Malatión, Metamidofós, Lambdacialotrina, Mancozeb, Carbofurán, Dimetoato, Cypermetrina, Diazinón y Deltametrina. Cada uno de estos pesticidas ha sido estudiado por su acción hormonal *in vitro* y algunos de ellos por sus efectos *in vivo* (42).

La principal problemática encontrada en cuanto al uso de pesticidas en Antioquia, es la mala utilización de estas sustancias, ya que gran parte de los productores no respetan las dosis recomendadas, los tiempos de retiro, ni el descanso de los potreros. Es frecuente la utilización de pesticidas en mezclas indiscriminadas, práctica que potencia la acción de estas sustancias como disruptores endocrinos, y sobre la cual aún no existen estudios disponibles (42).

Giraldo *et al*, en Colombia, hacen referencia a desórdenes uterinos causados por intoxicaciones subclínicas con pesticidas organofosforados, los cuales elevaron el porcentaje de endometritis e infertilidad, con alargamiento del intervalo entre partos, reabsorciones fetales, abortos precoces, aumento en el tiempo de expulsión de la placenta y de la involución uterina (26).

Un estudio realizado en 1995 en fincas del municipio de La Unión, Antioquia, tratando de asociar los bajos niveles de actividad de colinesterasa con problemas reproductivos no fue concluyente (7), aunque no se estudiaron los niveles hormonales de estos animales, los cuales pudieron haber estado afectados.

El Clorpirifos es el insecticida más usado actualmente en el Altiplano Norte de Antioquia, Colombia, para el control de los insectos predadores del pasto, además de su uso en otros cultivos (42).

Los resultados de una investigación concluida en el año 2001, en el municipio de Bello, Colombia, sobre el comportamiento del Clorpirifos en suelos y pastos, demuestran que las bajas temperaturas de la zona y los bajos valores del pH, retardan los procesos de transformación y degradación del pesticida en el ambiente, favoreciendo su biodisponibilidad en pasto (46).

La anterior situación es común a los municipios del Norte y Oriente de Antioquia (Colombia), que presentan suelos ácidos y bajas temperaturas y en donde gran parte de los productores usan los pesticidas indiscriminadamente, en forma de mezclas que potencian sus efectos negativos, y sin tener en cuenta las recomendaciones generales para su dosificación, aplicación, almacenamiento y periodo de retiro (42).

El Clorpirifos, aplicado a la dosis recomendada, persistió en el suelo y pasto por más de 60 días, tiempo superior al comúnmente usado para las aplicaciones de insecticidas y rotaciones de potreros en la zona, donde se ha registrado una disminución progresiva de los periodos de rotación aún por debajo de 45 días. Debido a lo anterior, se recomienda el monitoreo del pesticida en el pasto y en la leche, además de la realización de evaluaciones, tendientes a establecer los posibles efectos de la exposición crónica a bajas concentraciones sobre la nutrición y la reproducción del ganado (46).

La determinación de residuos de Clorpirifos. Experiencias en nuestro medio

Uno de los métodos utilizados para la determinación de residuos es la cromatografía de gases. Esta técnica consiste esencialmente, en la separación de los distintos componentes de una mezcla, empleando un proceso de separación de los componentes entre una fase estacionaria, soportada en una columna tubular que usualmente es un absorbente de diferentes clases, y una fase móvil que puede ser un gas o un líquido (18, 41).

Los componentes más débilmente retenidos en la fase estacionaria son desorbidos primero por la fase móvil y arrastrados al extremo opuesto de la columna en donde un detector produce una señal proporcional

(área o altura de pico) a la concentración del compuesto de interés en la mezcla; a una mayor concentración mayor será la señal (18).

Este método se ha usado para la detección de residuos de pesticidas en papa, tomate, fríjol, suelos, pastos y leche en el Centro de Investigaciones Ambientales y de Ingeniería y en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Pesticidas de la Universidad de Antioquia (46, 53)

En 1995, Orozco y López estandarizaron la metodología para la determinación de Clorpirifos en papa y tomate a través de cromatografía. Al analizar muestras de dichos productos provenientes de varios municipios del Oriente Antioqueño, sólo se encontraron residuos en una muestra, lo que pudo deberse al bajo contenido de lípidos de estos productos (53)

Para el proceso de cuantificación de un organofosforado en la leche, los residuos del pesticida deben ser separados de la grasa. Para esto existen métodos como la extracción líquido-líquido, que es una técnica de separación que remueve el pesticida de la muestra por contacto con un solvente no miscible con el agua de la matriz. El extracto obtenido se somete a secado para eliminar los residuos de agua y a un proceso de concentración. El extracto obtenido se disuelve en otro solvente más apropiado para análisis por cromatografía gaseosa. Recientemente se han propuesto métodos más selectivos como los de extracción en matriz sólida (18).

La determinación de los niveles de Clorpirifos y otros pesticidas en la leche, fue estandarizada por Hincapié en 1998, mediante cromatografía gaseosa, obteniendo porcentajes de recuperación entre 70 y el 105% a concentraciones de 0.5 partes por millón (ppm). Sin embargo, al analizar las muestras de leche, ninguna mostró presencia de los pesticidas (32).

Conclusiones y perspectivas

Desde la década de los 50 del siglo pasado, cuando se descubrió que el pesticida DDT (Diclorodifeniltricloroetano) tenía actividad estrogénica, la preocupación por este aspecto ha venido *in crescendo*. La presente revisión permitió observar como a partir de la década de los 70, con menos herramientas moleculares que las actuales, se inician trabajos que demuestran el impacto de los pesticidas

en diferentes especies animales, con énfasis en animales acuáticos y silvestres, muchos de los cuales no fueron mencionados aquí por su poca pertinencia al objetivo perseguido. El interés en esta problemática con respecto a los animales de granja, y específicamente en bovinos, surge hace dos décadas, sobre todo en los 90, pudiéndose afirmar, que los trabajos realizados hasta hoy, son relativamente escasos. Hasta el momento han predominado los modelos *in vitro* por lo cual se requiere ahondar en estudios *in vivo* con variables controladas para dilucidar las relaciones entre los niveles de los agentes disruptores y las hormonas que intervienen en el metabolismo y particularmente en la reproducción y así, en combinación con los trabajos *in vitro*, aproximarnos más a los mecanismos a través de los cuales actúan estas sustancias. El trabajo de Gore en el 2002 (28), ya mencionado, llama la atención sobre la poca cantidad de estudios sobre los efectos del Clorpirifos en el eje reproductivo, aunque éstos hayan demostrado la ausencia de efectos de este pesticida sobre el desarrollo del tracto reproductivo, la activación del receptor de estrógeno (ER) o la actividad aromatasa. Con una base tan escasa de información no es conveniente descartar al Clorpirifos como un disruptor endocrino. Adicionalmente, se podría pensar en una afección de los niveles de estrógenos no directamente por la aromatasa sino por vía del papel que juegan las hormonas tiroideas en el ritmo de liberación de los esteroides gonadales. A este respecto un estudio de Spicer *et al*, publicado en el 2001 (66),

sustenta la hipótesis de que las hormonas tiroideas pueden ejercer efectos estimulatorios sobre la función ovárica en ganado vacuno, actuando a nivel de las células de la granulosa y de la teca. El trabajo de Rawllings *et al* (58), realizado con ovejas y la demostración de la disminución marcada de los niveles de tiroxina por el suministro de Clorpirifos, hace pensar en algo similar en bovinos. En nuestro medio, el trabajo de Cano y Manrique (7), el cual buscaba relacionar los bajos niveles de actividad de colinesterasa con problemas reproductivos no fue concluyente y en él no se estudiaron los niveles hormonales de estos animales, los cuales pudieron haber estado afectados. El trabajo descriptivo de Hincapié (32) que analizó los niveles residuales de algunos pesticidas utilizados en hatos lecheros en el norte del departamento de Antioquia, Colombia, no halló los mismos, creando dudas sobre la metodología utilizada, la cual se basó en una encuesta que no logró probablemente, asegurar los niveles de exposición previa de los animales muestreados; esto ratifica la tesis de la realización de trabajos experimentales que permitan manipular las dosificaciones de los pesticidas, y además las variables colaterales que puedan afectar los resultados. Finalmente, el trabajo de Márquez (46), el cual determinó residuos de Clorpirifos en suelo y pasto Kikuyo, *Pennisetum clandestinum*, se muestra como un paso interesante para integrar mayor información proveniente de estudios *in vivo* con animales en producción y que pueden acoplarse a trabajos paralelos *in vitro* en nuestro medio.

Summary

Chlorpyrifos: a possible endocrine disrupter in dairy cattle

The use of pesticides for the control of those insects, fungi or plants that negatively affect or compete with animals or crops has allowed a remarkable increase in agricultural yield and cattle production. Nonetheless, the harmful effects of pesticides on human and environmental health have already been demonstrated and have become a major issue since the discovery of the role of pesticides as endocrine disrupters (ED). This name is given to substances that interfere with the synthesis, secretion, transport, union, action or elimination of natural hormones. The study of ED has received a great interest in the last two decades, not only because its consequences for public health through residues and contamination of food, but also because several pesticides have been related to reproductive problems in animals. The present review begins with a description of the current state of the use of insecticides (especially organophosphates) in farming production in Colombia, then, it examines up to date information regarding ED, their effects, and mechanisms discovered so far. It is evident the lack of information related to EDs in cattle, compared to the amount available on other species, especially wild animals and humans. Chlorpyrifos is an organophosphate insecticide, widely used in dairy cattle industry in Colombia. It has been reported to affect thyroid hormones and there is contradictory information regarding its effects upon estrogen. This review emphasizes the need to research the potential role of chlorpyrifos as an ED in the dairy region of the north of Antioquia, Colombia, to identify the possible relations between chlorpyrifos residues in milk and plasmatic levels of thyroid hormones and estrogens in dairy cows, as well as developing in vitro models for its study.

Key words: *organophosphates, pesticide, thyroxin.*

Referencias

1. Akhtar N, Kayani SA, Ahmad MM, Shahab M. Insecticide-induced changes in secretory activity of the thyroid gland in Rats. *J Appl Toxicol*. 1996; 16(5):397-400.
2. Alpuche GL. Plaguicidas organoclorados y medio ambiente. *Cienc Des*. 1991; 16(96):45-55.
3. Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermanndsen IM, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of currently used pesticides in assay for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002; 179(1):1-12.
4. Auger J, Kunstmann J, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New Engl J Med*. 1995; 332(5):281-285.
5. Brittebo EB, Kowalski B, Brand I. Binding of the aliphatic halides 1, 2-dibromoethane and chloroform in the rodent vaginal epithelium. *Pharmacol Toxicol*. 1987; 60(4):294-248.
6. Brotons G, Olea-Serrano M, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Persp*. 1995; 103(6):608-612.
7. Cano J, Manrique F. Asociación entre niveles bajos de actividad de colinesterasa y problemas reproductivos en vacas Holstein. Trabajo de Grado. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia, Medellín, 1995. 110 p.
8. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek N. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit Med J*. 1992; (305):609-613.
9. Chen H, Xiao J, Hu G, Zhou J, Xiao H et al. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. *J Toxicol Environ Health Part A*. 2002; 65(19):1419-1435.
10. Cochran RC, Kishiyama J, Aldous C, Carr WC Jr, Pfeifer KF. Chlorpyrifos: Hazard Assessment Based on a Review of the Effects of Short-term and Long-term Exposure in Animals and Humans. *Fd Chem Tox*. 1995; 33: 165-172.
11. Colborn T, vom Saal, Soto A. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspec*. 1993; 101:378-384.
12. Colón I, Caro C, Bourdony, C. Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect*. 2000; 108:79-82.
13. Comercialización de Plaguicidas 1999. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Instituto Colombiano Agropecuario, División de Insumos Agrícolas. Bogotá, 2001. 108 p.
14. Convenio de Competitividad de la Cadena Láctea y sus Derivados. <http://www.colombiacompite.gov.co/archivos/lacteos.xls> (última visita: 28-10-2003).
15. Córdoba D. Toxicología. 4ª. Edición, Manual Moderno. Bogotá (Colombia), 2001. 858 p.
16. Dai D, Tang J, Rose R, Hodsong E, Bienstock R *et al*. Identification of Variants of CYP3A4 and Characterization of Their Abilities to Metabolize Testosterone and Chlorpyrifos. *Pharmacol*. 2001; 29:825-823.
17. de la Riva C, Andon A. Organochlorine pesticides in cow's milk from agricultural region in northwestern Spain. *Bull Environ Contamin Toxicol*. 1991;46:527-533
18. Di Muccio A, Pelosi P, Camoni I, *et al*. Selective, solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk. *J Chromatog*. 1996;754:497-506
19. Du pont Agar Cross Hoja de Datos de Seguridad de Clorpirifos <http://e-net.agarcross.com.ar/msds/Clorpirifos.html> (última visita: 14-11-2003)
20. Endocrine Disruptor Screening Program Web Site U.S. Environmental Protection Agency EPA <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/index.htm> (última visita: 25-11-2003).
21. FAO/WHO. Pesticide Residues in Foods. Report of the Joint Meeting on Pesticide Residues 1984. 1985; p. 4-8.
22. FAO. Priority list of compounds scheduled for evaluation or reevaluation by Joint Meeting of Pesticide Residues (JMPPR) from 2000 – 2005 <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x7616e/x7616e0o.htm> (última visita: 9-11-2003)
23. Flores G, Carabias R, Rodríguez E, Herrero E. Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. *Rev Esp Sal Públ*. 2002; 76:133-147.
24. Gaines TR. Acute toxicity of pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1969; 14:515-534. En: Cochran RC, Kishiyama J, Aldous C, Carr WC Jr, Pfeifer KF. Chlorpyrifos: Hazard Assessment Based on a Review of the Effects of Short-term and Long-term Exposure in Animals and Humans. *Fd Chem Tox*. 1995; 33: 165-172.
25. Gandolfi F, Pocar P, Brevini T, Fischer B. Impact of endocrine disrupters on ovarian function and embryonic development. *Dom Anim Endocrinol*. 2002;23(1-2):189-201
26. Giraldo S. L.F. Mejía Z., G.L. y Montoya R., G.A. Medición de actividad de la colinesterasa en ganado Holstein de la Unión, Antioquia. Trabajo de Grado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad de Antioquia, Medellín, 1991. 73p.
27. Go V, Garey J, Wolff MS, Pogo BGT. Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ Health Perspec*. 1999;107:173-177
28. Gore AC. Organochlorine pesticides directly regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression and biosynthesis in the GT1-7 hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 192:157-170.
29. Gray L, Kelce W, Monosson E, Ostby J, Birnbaum L. Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: Reduced ejaculated epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995; 131:108-118.
30. Hayes H. Case-control study of canine malignant lymphoma: Positive association with dog owner's use of 2, 4-D herbicides. *J Nation Cancer Inst*. 1991;83(17):1226-1231
31. He F. Neurotoxic Effects of Insecticides-Current and Future Research: A Review. *Neurotoxicol*. 2000; 21: 829-836.

32. Hincapié M. Análisis en leches de los niveles residuales de algunos pesticidas utilizados en hatos lecheros en el Norte del Departamento de Antioquia. Trabajo de Grado en Maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín. 1998. 116 p.
33. Hurley PM, Hill RN, Whiting RJ. Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environ Health Perspec.* 1998; 106:437-445.
34. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. 2001. Restricciones y Prohibiciones de Plaguicidas de Uso Agrícola en Colombia. 11 p.
35. Irving S, Cawood E, Richardson D. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Br Med J.* 1996; 312:467-471.
36. Kelce WR, Monosson E, Gamcsik MP, Laws SC, Gray LE. Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994; 126:276-285.
37. Klotz DM, Arnold SF, McLachlan JA. Inhibition of 17 beta-estradiol and progesterone activity in human breast and endometrial cancer cells by carbamate insecticides. *Life Sci.* 1997; 60(17):1467-1475.
38. Krishnan V, Safe S. Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and Dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993; 120:55-61.
39. Krishnan A, Stathis P, Permuth S, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinol.* 1993; 132(8):2279-2286.
40. Kupfer D, Bulger W. Estrogenic properties of DDT and its analogs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1980; 14: 358-367.
41. Lacorte S, Molina C and Barcelo D. Screening of organophosphoruspesticides in environmental matrices by various gas chromatographics technique. *Analytic Chimica Acta.* 1993; 281:71-84.
42. Loaiza A, Jaramillo J, León F, Incidencia de Factores Sociales, Económicos, Culturales y Técnicos en el uso de Agroquímicos por Pequeños Productores del Departamento de Antioquia. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología, PRONATTA, Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Diciembre 2000; 172 p.
43. Lyons G. Endocrine disrupting pesticides. *Pestic News.* 1999; 46:16-19.
44. Madrigal A. La problemática de los Plaguicidas. Publicación Técnica No.17. Dirección Seccional de Salud de Antioquia. Universidad Nacional, Medellín 2002; 86 p.
45. Marty MS, Crissman JW, Carney EW. Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17beta-estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. *Toxicol Sci.* 1999; 52: 269-277.
46. Márquez S. Evaluación de Algunos Efectos de la Contaminación por Aplicación de Lorsban (Chlorpirifos) en un Suelo y un Cultivo de Kikuyo en el Norte Antioqueño. Trabajo de Grado en Maestría, Universidad de Antioquia, Medellín, 2001. 142 p.
47. Mizuyachi K, Son DS, Rozman K, Terranova P. Alteration in ovarian gene expression in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: reduction of cyclooxygenase-2 in the blockage of ovulation. *Reprod Toxicol.* 2002; 16(3):299-307.
48. Moore A, Waring CP. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquat Toxicol.* 2001; 52(1):1-12.
49. Nakagawa R, Hirakana H and Hori T. Estimation of 1992-1993 dietary intake of organochlorine and organophosphorus pesticides in Fukuda, Japan. *J AOAC Int.* 1995; 78:921-929.
50. Nolan R, Rich D, Freshour N and Saunder J. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers following single oral and dermal doses. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984; 73: 8-15.
51. Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales. Lista provisoria de Plaguicidas Registrados en Chile Prohibidos o Severamente Restringidos por Gobiernos y sus Efectos Sanitarios y Ambientales <http://www.relca.net/oca/plaguicidas/plag03.htm> (última visita: 2-10-2003).
52. Olea N. Informe Agricultura y Salud. 2001 <http://www.aldearural.com/alpujarra/disc1/0000000a.htm> (última visita: 24-10-2003).
53. Orozco R, López C. Determinación de residuos de pesticidas (Lorsban y Bravo 500) en papa y tomate provenientes del Oriente Antioqueño por cromatografía de gases. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, 1995. 111 p.
54. Ortega J, Espinoza F, López L. El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: Retos ante el Tratado de Libre Comercio. *Sal Pública México.* 1994; 36 (6):624-632.
55. Perera F, Rauh V, Tsai WY, Kinney P, et al Effects of Transplacental Exposure to Environmental Pollutants on Birth Outcomes in a Multiethnic Population. *Environ Health Perspec.* 2003; 111(2):201-205.
56. Porter WP, Green SM, Debbink NL, Carlson I. Groundwater pesticides: interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. *J Toxicol Environ Health.* 1993; 40(1):15-34.
57. Ramon A, Martinez H. Residuos de Aldrin, Lindano y Heptaclor en leches esterilizadas. *Diaeta.* 2001; 94:15-21.
58. Rawlings NC, Cook SJ, Waldbillig D. Effects of the Pesticides Carbofuran, Chlorpyrifos, Dimethoate, Lindane, Triallate, Trifluralin, 2,4-D, and Pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *Journal of Toxicol Environ Health Part A.* 1998; 54(1):21-36.
59. Rigas ML, Okino MS, Quackenboss JJ. Use of a pharmacokinetic model to assess chlorpyrifos exposure and dose in children, based on urinary biomarker measurement. *Toxicol Sci.* 2001; 61:374- 381.
60. Santamarta J. La amenaza de los disruptores endocrinos. *World Watch.* España, julio de 2001. http://www.lainsignia.org/2001/julio/cyt_014.htm
61. Sherman JD. Chlorpyrifos (Dursban)-Associated Birth Defects: A proposed syndrome, report of four cases, and

- discussion of the toxicology. *Int J Occup Med Toxicol*. 1995; 4: 417-431.
62. Sinha N, Lal B, Singh TP. Pesticides induced changes in circulating thyroid hormones in the freshwater catfish *Clarias batrachus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparat Pharmacol Toxicoll*. 1991; 100 (1-2):107-110.
 63. Singh AK. Acute effects of acephate and methamidophos and interleukin-1 on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis in and release from the hypothalamus in vitro *Comparat Biochem Physiol Part C: Toxicol & Pharmacol*. 2002; 132(1)9-24.
 64. Smegal DC. Human Health Risk Assessment. Chlorpyrifos. U.S Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs. Health Effects Division, 2000. 131 p.
 65. Smith G, Watson B, Fischer F. Investigation on Dursban insecticide. Metabolism of (Cl)-(o,o-diethyl)-3,5,6-trichloro-2-pyridil phosphorothioate in rats. *J Agricul Food Chem*. 1967; 15:132-138.
 66. Spicer LJ, Alonso J, Chamberlain CS. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. *J Dairy Sci*. 2001; 84(5):1069-1076.
 67. Sweeney T. ¿Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Dom Anim Endocrinol*. 2002; 23(1-2):203-209.
 68. Tamura H, Maness SC, Reischmann K, Dorman DC, Gray LE et al. Androgen receptor antagonism by the organophosphate insecticide Fenitrothion. *Toxicol Sci*. 2001; 60:56-62.
 69. Toppari J, Larsen J, Christiansen P, Giwercman A, Skakkebaek N. et al. Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. *Environ Health Perspec*. 1996; 104 (Sup.4):741-803.
 70. vom Saal FS, Ángel SC, Palanza P, Boechler M, Parmigiani S. Estrogenic pesticides: binding relative to Estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behaviour in male mice. *Toxicol letters*. 1995; 77:343-350.
 71. Widespread Pollutants with Endocrine-disrupting Effects. *Our Stolen Future*, the Book Website <http://www.ourstolenfuture.com/Basics/chemlist.htm> (última visita: 10-7-2003).
 72. Zaidi SS, Bhatnagar VK, Gandhi SJ, Shah MP, Kulkarni PK et al. Assessment of thyroid function in pesticide formulators. *Hum Experim Toxicol*. 2000; 19 (9):497-501.