

## Endocriene verstoorders: werkingsmechanismen en gevolgen voor de vruchtbaarheid van de veestapel

<sup>1</sup>E.M.L. Petro, <sup>1</sup>J.L.M.R. Leroy, <sup>1</sup>I.G.F. Goovaerts, <sup>2</sup>W. De Coen, <sup>1</sup>P.E.J. Bols

<sup>1</sup>Laboratorium voor de Fysiologie van de Huisdieren, Departement Diergeneeskundige Wetenschappen, Faculteit van de Farmaceutische, Biomedische en Diergeneeskundige Wetenschappen, Universiteit Antwerpen

<sup>2</sup>Laboratorium voor Ecofysiologie, Biochemie en Toxicologie, Departement Biologie, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Antwerpen

Universiteit Antwerpen, Campus Drie Eiken  
Universiteitsplein 1 - Gebouw U  
B - 2610 Wilrijk

### SAMENVATTING

**De fertiliteit van hoogproductief melkvee is de afgelopen jaren wereldwijd aanzienlijk gedaald. In dezelfde periode is de aanwezigheid van chemicaliën in het milieu sterk toegenomen. Enkele van deze stoffen vertonen endocrien versturende eigenschappen waardoor ze onder andere reproductiestoornissen kunnen veroorzaken. Deze ‘endocriene verstoorders’ (EVs) werden bijgevolg recentelijk aangebracht als een van de bijkomende mogelijke oorzaken van het multifactorieel vruchtbaarheidsprobleem van hoogproductief melkvee.**

**In dit artikel worden de aard en werking van EVs besproken en worden het onderzoek naar en de specifieke eigenschappen van EVs geschetst. Vervolgens wordt ook de mogelijke link tussen de aanwezigheid van EVs in het milieu en hun invloed op de vruchtbaarheid van nutsdieren besproken.**

### INLEIDING

De laatste decennia wordt wereldwijd een spectaculaire daling van de vruchtbaarheid van hoogproductief melkvee waargenomen. Dit uit zich vooral in een verlengde tussenkalftijd (Opsomer *et al.*, 1998 ; Shrestha *et al.*, 2004) en een toename van het aantal inseminaties per dracht. In België zijn deze parameters de laatste jaren toegenomen van respectievelijk 409 naar 420 dagen en van 1,53 naar 1,71 (CRV, 2010). Deze neerwaartse fertiliteitstrend wordt veroorzaakt door verschillende factoren, zoals het toegediende hoogenenergetische en proteïnerijke dieet (Butler, 1998), de toename van de bedrijfsgrootte (Fahey *et al.*, 2002), de genetische selectie ten voordele van de melkopbrengst (Snijders *et al.*, 2000) en door de negatieve invloed van metabole stoornissen tijdens de periode van de negatieve energiebalans kort na de partus op de eicel- en daaropvolgende embryokwaliteit (Leroy *et al.*, 2005).

Tezelfdertijd zijn wereldwijd de ontwikkeling en het gebruik van chemicaliën sterk gestegen met als resultaat een verhoogde concentratie van deze stoffen in het milieu. Sommige van deze chemicaliën blijken endocrien versturende eigenschappen te bezitten (Colborn *et al.*, 1993). Deze ‘endocriene verstoorders’ zijn natuurlijke of synthetische verbindingen die het vermogen hebben om de synthese, de opslag en het metabolisme van hormonen te verstoren (Sweeney, 2002). Bovendien kunnen ze zich gedragen als agonisten en/of antagonist van deze natuurlijke hormonen (Pocar *et al.*, 2003). Mens en dier komen in contact met deze verbindingen door het eten en drinken van gecontamineerd

voedsel en water, het inademen van verontreinigde lucht, of via contact met vervuilde grond (Brevini *et al.*, 2005). Momenteel is bekend dat EVs een nadelige invloed kunnen hebben op onder andere de schildklierfunctie, het immuunsysteem en de voortplanting (Gandolfi *et al.*, 2002). Bovendien bezitten verscheidene EVs ook carcinogene eigenschappen (Colborn *et al.*, 1993 ; Helleday *et al.*, 1999). De laatste jaren werd door verscheidene onderzoekers geopperd dat EVs een van de oorzaken zouden kunnen zijn van de vruchtbaarheidsproblemen geobserveerd bij nutsdieren (Sweeney, 2002 ; Rhind, 2005).

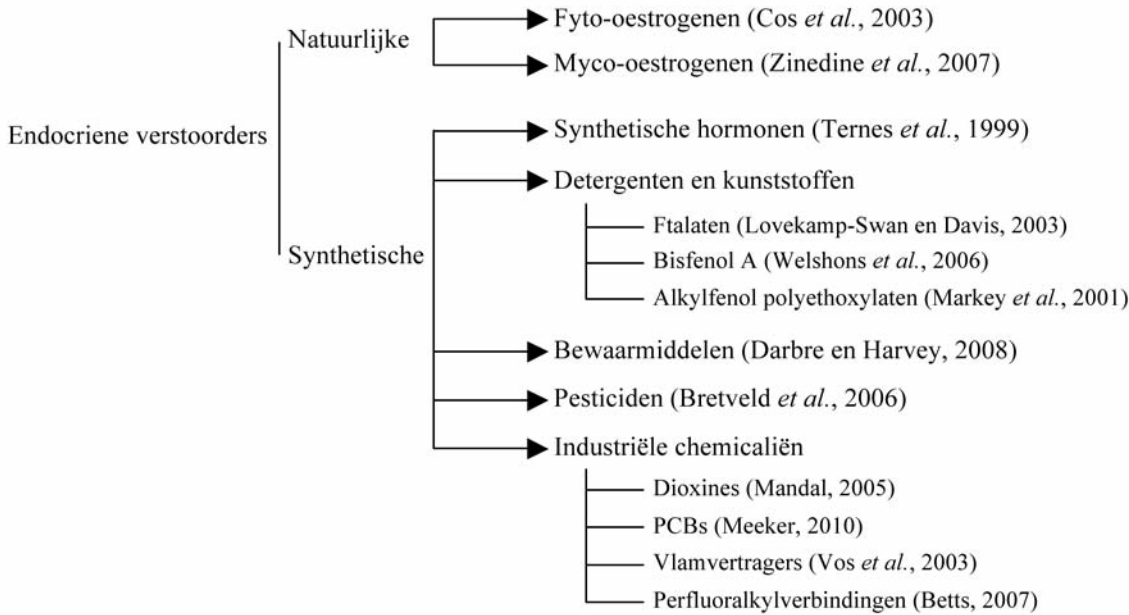
### WELKE ENDOCRIENE VERSTOORDERS ZIJN REEDS BESCHREVEN?

Momenteel zijn ongeveer 60 chemicaliën geïdentificeerd en gecatalogiseerd als endocriene verstoorders (Brevini *et al.*, 2005). Deze groep kan opgesplitst worden in natuurlijke (fyto- en myco-oestrogenen) en synthetische EVs (groeihormonen, detergenten, kunststoffen, bewaarmiddelen, pesticiden en industriële chemicaliën) (Figuur 1).

### Natuurlijke endocriene verstoorders

#### *Fyto-oestrogenen*

Fyto-oestrogenen zijn endocrien actieve stoffen in planten. De endocriene werking van deze verbindingen berust in hoofdzaak op het feit dat ze kunnen binden op de oestrogeenreceptor (Cos *et al.*, 2003). De gevolgen van een blootstelling aan fyto-oestrogenen zijn afhan-



**Figuur 1. Overzicht van de verschillende groepen endocriene verstoorders.**

kelijk van het levensstadium van het blootgestelde organisme, de opnameduur en -dosis. Bovendien blijkt het effect ook speciesafhankelijk te zijn, waarschijnlijk mee bepaald door de concentratie van natuurlijke oestrogenen in het bloed. Fyto-oestrogenen werken agonistisch bij species met een lage circulerende natuurlijke oestrogeenconcentratie (schapen, rundvee), terwijl species met een relatief hoge circulerende oestrogeenconcentratie, zoals de mens, eerder af te rekenen hebben met antioestrogene effecten van deze fyto-oestrogenen (Adams, 1995).

Fyto-oestrogenen blijken echter ook een positieve werking te hebben bij allerlei oestrogeenafhankelijke aandoeningen, zoals borst- en prostaatkanker, osteoporose en cardiovasculaire aandoeningen (Cos *et al.*, 2003). Bovendien zouden fyto-oestrogenen werkzaam zijn tegen aandoeningen die optreden tijdens de menopauze. Een te grote opname van fyto-oestrogenen wordt, niettegenstaande deze positieve effecten, wel in vraag gesteld. Vleesvervangers worden vaak vervaardigd op basis van soja (*Glycine max*), een bron van fyto-oestrogenen, zoals de isoflavonen daidzeïne en genisteïne (Baber, 2010). Bovendien drinkt een beduidend aantal baby's sojamelk. Momenteel wordt aangenomen dat de consumptie van sojaproducten veilig is voor kinderen (Klein, 1998) maar toch is het nog steeds onduidelijk of de hoge dosis fyto-oestrogenen die op deze manier op zeer jonge leeftijd wordt opgenomen al dan niet nefast kan zijn voor het latere leven van het kind. Rode klaver (*Trifolium pratense*) en hop (*Humulus lupulus* L.) zijn andere bronnen van fyto-oestrogenen, waarin respectievelijk de isoflavonen daidzeïne, formononetine, biochanine A en genisteïne en de flavonoiden 8- en 6- prenylnaringenine te vinden zijn (Chadwick *et al.*, 2006; Overk *et al.*, 2008). 8- Prenylnaringenine is trouwens een van de meest potente fyto-oestrogenen (Zanoli en Zavatti, 2008). Uit *in vitro* ex-

perimenten blijkt dat quasi alle fyto-oestrogenen, naast een hormonale activiteit, ook proapoptotische effecten vertonen en genotoxische eigenschappen bezitten door onder andere de inductie van micronuclei, kleine kernen die gevormd worden tijdens de celdeling wanneer (delen van) chromosomen niet worden ingebouwd in de dochtercellen (Stopper *et al.*, 2005).

#### *Myco-oestrogenen: zearalenone*

Zearalenone, een niet-steroïdaal mycotoxine met oestrogene activiteit, wordt gesynthetiseerd door *Fusarium* fungi (Bennett en Klich, 2003). Deze schimmels kunnen verschillende soorten granen infecteren zowel tijdens de groei als tijdens de opslag ervan in een vochtige omgeving. Hierdoor kan zearalenone ook aanwezig zijn in allerlei graanproducten, zoals bloem, mout en bier (Zinedine *et al.*, 2007).

Zearalenone bezit een lage acute toxiciteit. Langdurige toxiciteitstudies met muizen gaven echter aan dat deze verbinding wel een chronische toxiciteit kan bezitten met onder meer een mogelijke rol bij het ontstaan van leverkanker; ratten vertoonden echter geen stijging van het aantal tumoren (NTP, 1982). Bovendien blijkt dat zearalenone kan binden aan beide oestrogeenreceptorsubtypes (ER $\alpha$  en ER $\beta$ ) (Kuiper *et al.*, 1998) en dat het een van de sterkste natuurlijk voorkomende oestrogenen is (Stopper *et al.*, 2005). Zearalenone wordt na orale toediening snel geabsorbeerd en gereduceerd tot  $\alpha$ - en  $\beta$ -zearalenol. Deze worden op hun beurt nog verder gemetaboliseerd tot  $\alpha$ - en  $\beta$ -zearalanol. De observatie dat enerzijds  $\alpha$ -zearalenol een grotere oestrogene activiteit bezit dan zearalenone of  $\beta$ -zearalenol (Shier *et al.*, 2001) en dat anderzijds de ratio tussen  $\alpha$ - en  $\beta$ -zearalenol speciesafhankelijk is, kan een verklaring zijn voor het verschil in sensitiviteit tussen species na blootstelling aan zearalenone (Fink-

Gremmels en Malekinejad, 2007). Door de combinatie van enerzijds wereldwijde hoge concentraties in voedsel en anderzijds de vaststelling dat zearalene in staat is om *in vitro* MCF-7 borstkankercellen te laten prolifereren in afwezigheid van oestrogenen rijst de vraag of deze verbinding bijdraagt tot de stijgende incidentie van borstkanker gedurende de afgelopen decennia (Yu *et al.*, 2005).

## Synthetische endocriene verstoorders

### *Synthetische hormonen*

In tegenstelling tot de VS en Canada, waar het toegelaten is om bepaalde synthetische groeihormonen te gebruiken in de veeteelt, is dit gebruik reeds sinds 1988 in Europa verboden (Wilson *et al.*, 2002). Een van de meest toegediende groeihormonen is trenbolone acetaat, een anabool steroïde. Onderhuidse implantaten zorgen voor een geleidelijke vrijstelling in het bloed waar het gehydrolyseerd wordt tot 17 $\beta$ -trenbolone, een agonist van de androgeenreceptor (Schiffer *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2002). Via de uitwerpselen komen 17 $\beta$ -trenbolone en metabolieten vervolgens in de omgeving terecht. Andere toegelaten groeihormonen in de Noord-Amerikaanse veeteelt zijn melengestrol acetaat (enkel VS) en zeranol (=  $\alpha$ -zearalanol) (Shier *et al.*, 2001; Chung en Johnson, 2009).

In de (dier)geneeskunde worden synthetische oestrogenen voor allerlei doeleinden gebruikt, soms met onverwachte, schadelijke gevolgen. Zo werd vanaf 1948 diethylstilbestrol (DES) voorgeschreven aan vrouwen om spontane abortus te vermijden. Toen echter bleek dat er zich bij de dochters van moeders die DES hadden gebruikt, allerlei reproductieve stoornissen ontwikkelden, werd DES in 1971 van de markt gehaald (Colborn *et al.*, 1993). Een van de meest bekende toepassingen van synthetische oestrogenen is het gebruik als anticonceptiemiddel. Evenals de natuurlijke oestrogenen worden deze synthetische varianten via de feces uitgescheiden en komen ze in het rioolwater terecht. Onderzoek heeft uitgewezen dat ze aanwezig blijven in de effluenten van waterzuiveringsstations en dus in het milieu terechtkomen (Ternes *et al.*, 1999).

Zowel synthetische androgenen als oestrogenen blijken dus, bovenop de reeds aanwezige uitgescheiden natuurlijke geslachtshormonen, in de vrije natuur terecht te komen. Of deze extra hoeveelheid schadelijk is voor het ecosysteem, is een groot discussiepunt in de wetenschap (Caliman en Gavrilescu, 2009).

### *Detergenten en kunststoffen*

In deze grote groep chemicaliën bezitten enkele veelgebruikte verbindingen een endocriene activiteit. De belangrijkste en/of meest bekende zijn de ftalaten, bisfenol-A en de alkylfenol polyethoxylaten.

### Ftalaten

Ftalaten worden vooral gebruikt als *plasticizers* om

plastic of andere materialen plooibaar te houden, bijvoorbeeld in de voedsel- en bouwindustrie, bij de fabricatie van speelgoed, medische apparatuur en farmaceutica (Lovekamp-Swan en Davis, 2003; Latini *et al.*, 2006). Bovendien zijn ze ook aanwezig in verzorgingsproducten en verf. Per jaar wordt meer dan 8 miljoen ton ftalaten verbruikt (Lovekamp-Swan en Davis, 2003). Doordat ftalaten niet covalent gebonden zijn aan kunststoffen, worden ze gemakkelijk losgelaten in het milieu (Latini *et al.*, 2006). Van alle ftalaten is di-(2-ethylhexyl) ftalaat (DEHP) het meest verspreid in de natuur en wordt ook het meeste onderzocht (Harris en Sumpter, 2001).

Prenatale blootstelling van proefdieren aan ftalaten geeft aanleiding tot een verminderde foetale testosteroonsynthese (Parks *et al.*, 2000). Onderzoekers spreken over het 'het ftalaatsyndroom' dat wordt gekenmerkt door vervormingen van de epididymis, het vas deferens, de zaadblaasjes, de prostaat en externe genitaliën, en verder door cryptorchidisme en feminisatie (Latini *et al.*, 2006). Ftalaten zijn via de 'peroxisoom proliferator-geactiveerde receptoren' (PPARs) een familie van nucleaire receptoren, en via de inhibitie van FSH gestimuleerde cAMP-productie ook in staat om de folliculogenese te verstoren (Lovekamp-Swan en Davis, 2003).

### Bisfenol-A

Bisfenol-A (BPA) wordt aangewend bij de productie van polycarbonaat kunststoffen en epoxyharsen en toegevoegd als additief bij andere kunststoffen, zoals polyvinylchloride (PVC) en polyethyleen tereftalaat (PET), waardoor BPA te vinden is in allerlei plastic voorwerpen, zoals bewaardozen, flessen en speelgoed. BPA is ook aanwezig in de binnenbekleding van voedselconserven en in tandheelkundige harsen (Maffini *et al.*, 2006; Welshons *et al.*, 2006). In 2003 werd wereldwijd bijna 3 miljoen ton BPA geproduceerd (Welshons *et al.*, 2006). Bij het veelvuldig wassen, verwarmen en/of bij contact met zure of basische bestanddelen kunnen BPA-monomeren weglekken en zo in de voedselketen terechtkomen (Brotons *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 2009).

Bisfenol-A is in staat te binden aan beide subtypes van de oestrogeenreceptor en kan bovendien snelle cellulaire responsen uitlokken door te binden aan membraangebonden oestrogeenreceptoren (Kuiper *et al.*, 1998; Wozniak *et al.*, 2005). Bovendien zou BPA de spermaproductie en motiliteit verlagen, de expressie van de oestrogeen- en progesteronreceptor in het endometrium verhogen en aneuploidie bij oocyten veroorzaken (Maffini *et al.*, 2006). BPA zou ook de werking van de schildklier beïnvloeden als antagonist van het schildklierhormoon trijodothyronine (T3) (Moriyama *et al.*, 2002). De metabolisatie van BPA gebeurt bij zoogdieren via glucuronisatie of sulfatie van BPA in de lever. Bovendien is een vlotte afbraak van BPA species- en zuurstofafhankelijk. Zo wordt BPA in rivierwater afgebroken onder aërobe, maar niet onder anaërobe condities (Kang *et al.*, 2006). Verontrustend is het feit



dat tijdens muriene *in vivo* experimenten BPA fysiologische effecten induceert bij concentraties die lager liggen dan de vastgestelde referentiedosis (50 µg/kg/dag) (Nagel *et al.*, 1999). Bovendien liggen de BPA-waarden in humane bloedstalen hoger dan de schadelijke concentraties uit *in vitro* studies (Welshons *et al.*, 2006). Onderzoekers pleiten daarom voor een nieuwe, meer volledige BPA-risicoanalyse (vom Saal en Hughes, 2005).

### Alkylfenol polyethoxylaten

Een laatste groep chemicaliën binnen deze groep zijn de alkylfenol polyethoxylaten (APEOs). Deze verbindingen worden gebruikt voor de productie van kunststoffen en papier, in de textielindustrie en als emulgator tijdens de fabricage van vloeibare pesticiden. Ook zijn APEOs aanwezig in reinigingsmiddelen en verzorgingsproducten (Markey *et al.*, 2001). Wereldwijd wordt de productie van deze verbindingen geschat op meer dan 500 000 ton per jaar (Ying *et al.*, 2002). Algemeen wordt aangenomen dat APEOs hoofdzakelijk via biodegradatie verdwijnen uit het milieu met de vorming van kortketenAPEO-metabolieten die op hun beurt volledig kunnen deëthoxileren tot alkylfenolen, zoals nonylfenol en octylfenol (Montgomery-Brown en Reinhard, 2003).

De oestrogene werking van APEOs kan verklaard worden door hun bindingscapaciteit op de oestrogeenreceptor (White *et al.*, 1994), waarbij octylfenol de sterkste oestrogene eigenschappen heeft. Omdat APEOs hoofdzakelijk via het afvalwater van waterzuiveringsstations in het milieu verschijnen, worden deze verbindingen veelal gevonden in het oppervlaktewater en in waterorganismen (Ying *et al.*, 2002). Vissen die stroomafwaarts van deze zuiveringsstations leven, blijken talrijke reproductieve stoornissen te vertonen waarbij interseksualiteit een van de voornaamste is (Jobling en Tyler, 2003). Mannelijke vissen produceren bijvoorbeeld vitellogenine, een eiwit dat in normale omstandigheden enkel door vrouwelijke vissen wordt aangemaakt (Purdom *et al.*, 1994). Uit analyses uitgevoerd in Groot-Brittannië bleek dat APEOs en APEO-metabolieten samen met natuurlijke en synthetische oestrogenen de belangrijkste oestrogeen actieve chemicaliën zijn in dit 'gezuiverd water' (Jobling en Tyler, 2003). De concentratie van APEOs en APEO-metabolieten bleek zelfs hoger te liggen (ng/ml) dan de natuurlijke en synthetische oestrogenen (pg/ml) (Ternes *et al.*, 1999 ; Ying *et al.*, 2002). Naast reproductieve stoornissen vertonen deze vissen ook aandoeningen van de nieren, het immuunsysteem en zijn er aanwijzingen voor genotoxiciteit (Liney *et al.*, 2006). In waterzuiveringsstations hechten APEO-metabolieten zich ook aan het aanwezige slib (Ahel *et al.*, 1994 ; La Guardia *et al.*, 2001), waardoor ze onze voedselketen kunnen binnendringen, aangezien dit slib onder bepaalde voorwaarden mag gebruikt worden als bemesting voor landbouwgronden. Om die reden adviseerde het Wetenschappelijk Comité van het FAVV om de lijst van chemische contaminanten, waarvoor maximumwaarden in slib worden opgesteld, uit te breiden met

chemicaliën die in een Europees werkdocument worden vernoemd (EC, 2000 ; FAVV, 2002). Tot deze groep behoren onder meer DEHP, PCBs, dioxines en nonylfenol(ethoxylaten).

### Bewaarmiddelen

#### Parabenen

Parabenen zijn een groep bewaarmiddelen bestaande uit zeven alkylesters van p-hydroxybenzoezuur, hun gezamenlijke metaboliet. Ze worden vooral in cosmetica en toiletartikelen gebruikt en ze worden ook toegevoegd aan voedsel wegens hun antimicrobiële activiteit (Byford *et al.*, 2002; Darbre en Harvey, 2008). Parabenen treden dus voornamelijk via de orale en dermale weg het lichaam binnen, waarbij vooral deze laatste blootstellingsroute van belang blijkt te zijn (Darbre en Harvey, 2008). De gedetecteerde parabeenconcentraties in urine zijn overwegend hoger dan degene in bloed, wat wijst op een snelle metabolisatie en verwijdering uit het lichaam van deze stoffen (Boberg *et al.*, 2010).

Epidemiologisch onderzoek heeft uitgewezen dat meer kankergezwellen worden aangetroffen in het kwadrant het dichtst bij de oksel, de plaats die het meeste in contact komt met deodorants. Alle parabenen worden ook in borstkankerweefsel gevonden (Darbre en Harvey, 2008). *In utero* blootstelling van ratten aan butylparabeen veroorzaakt een verlaagde expressie van zowel ERβ in de ovaria als van het *Steroidogenic Acute Regularory-protein* (StAR) in de bijnieren bij vrouwelijke foeti. Deze verstoorde StAR-expressie kan de steroïdogense beïnvloeden aangezien StAR verantwoordelijk is voor het transport van cholesterol naar het binnenste mitochondriaal membraan, een essentiële stap in de steroïdogense (Taxvig *et al.*, 2008). Zowel (anti-)oestrogene als anti-androgene effecten worden toegeschreven aan parabenen (Chen *et al.*, 2007). De oestrogene werking van parabenen zou toenemen met de ketenlengte en de vertakking ervan (Okubo *et al.*, 2001 ; Byford *et al.*, 2002). Via de inhibitie van sulfotransferasen hebben parabenen ook een indirecte oestrogene werking, doordat deze inhibitie resulteert in hogere vrije oestradiolconcentraties (Prusakiewicz *et al.*, 2007). In contrast hiermee staat het inhiberende effect van deze stoffen op aromatase, het enzym verantwoordelijk voor de omzetting van testosteron naar oestradiol (Boberg *et al.*, 2010).

### Pesticiden

Pesticiden zijn in staat om allerlei schadelijke effecten te veroorzaken, zoals hoofdpijn, ademhalingsproblemen, neurologische of psychische klachten en huidirritatie (Bretveld *et al.*, 2006). De blootstelling aan pesticiden werd ook in verband gebracht met een vertraagde foetale groei, een verkorte zwangerschap en spontane abortus (Stillerman *et al.*, 2008). Verscheidene pesticiden vertonen ook endocrien versturende eigenschappen: *in vitro* inhiberen of induceren verschil-

lende imidazole fungiciden bijvoorbeeld aromatase (Vinggaard *et al.*, 2000). Andere pesticiden, zoals onder meer methoxychlor, chloordecon (Kepone), dieldrin en endosulfan, bezitten oestrogene eigenschappen (Bretveld *et al.*, 2006).

Wegens deze brede waaier van schadelijke effecten werden de afgelopen jaren talrijke pesticiden van de markt gehaald en vervangen door minder schadelijke producten. Enkele pesticiden hebben echter een zodanig efficiënte werking waardoor een verbod van deze producten in derdewereldlanden niet zo vanzelfsprekend is. Zo is dichloordifenyiltrichloorethaan (DDT) tot op vandaag nog altijd een van de meest doeltreffende en tegelijk goedkope producten in de strijd tegen anophelesmuggen, verantwoordelijk voor de transmissie van de malariaparasiet die nog elk jaar meer dan één miljoen slachtoffers maakt (IEH, 1999 ; WHO, 2006). In 2006 heeft de wereldgezondheidsorganisatie (WHO) daarom beslist om de behandeling van muren en daken met DDT in risicogebieden opnieuw aan te bevelen in de strijd tegen malaria (WHO, 2006).

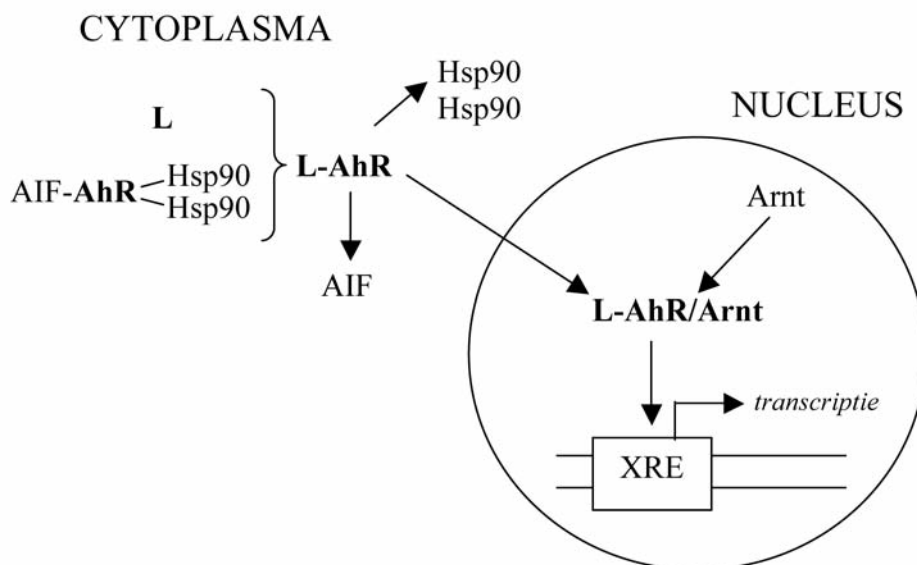
### Industriële chemicaliën

In deze groep chemische verbindingen zijn polygechlorineerde bifenylen (PCBs) en dioxines veruit de bekendste endocriene verstoorers. In België kent het grote publiek deze verbindingen vooral van de 'dioxinecrisis' in 1999, waarbij gerecycleerd vet dat werd gebruikt voor de productie van diervoeding, gecontamineerd werd met een dioxinebevattend PCB-mengsel (Bernard *et al.*, 2001). Minder bekend maar daarom niet minder overvloedig aanwezig, zijn de zogenaamde 'vlamvertragers' en de aan belangstelling winnende perfluoralkylverbindingen.

### Polygechlorineerde dibenzo-p-dioxines

Polygechlorineerde dibenzo-p-dioxines (PCDDs) zijn een groep van milieucontaminanten waarvan 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) het prototype en de meest toxische verbinding is. Dioxines worden gevormd in verbrandingsovens, tijdens bosbranden en bij industriële processen, zoals de productie van herbiciden en het bleken van papierpulp (Boerjan *et al.*, 2002). De blootstelling aan dioxines kan onder andere leiden tot chlooracne bij mensen, een gespleten verhemelte bij muizen, een verstoorde werking van het immuunsysteem en een verhoogd risico op kanker (Bock en Kohle, 2006). Dioxines bezitten ook teratogene, embryotoxische en neurotoxische eigenschappen (Mandal, 2005).

Dioxines oefenen hun negatieve invloed hoofdzakelijk uit via binding op de arylhydrocarbonreceptor (AhR), ook wel de dioxinereceptor genoemd (Figuur 2). Deze receptor is een ligand geactiveerde transcriptiefactor die zich na de binding van een ligand verplaatst van het cytoplasma naar de nucleus, waar de receptor dimeriseert met de AhR-nucleaire translocator (Arnt). De heterodimeer bindt op zijn beurt specifieke DNA enhancer sequenties, bekend als xenobiotische respons elementen (XREs) (Pocar *et al.*, 2006). Hoogstwaarschijnlijk is de toxiciteit van dioxines toe te schrijven aan een gestoorde activering van de AhR door de binding van deze toxische liganden, met een verstoring van de fysiologische functies van de receptor als gevolg (Bock en Kohle, 2006). Om de toxiciteit van verbindingen die werken via de AhR te 'scoren', maakt men gebruik van een toxische equivalentiefactor (TEF) waarbij de toxiciteit van deze verbindingen uitgedrukt wordt in functie van die van TCDD (TEF van TCDD = 1) (Larsen, 2006).



**Figuur 2.** Werkingsmechanisme van de arylhydrocarbonreceptor (AhR): L = ligand, AIF = AhR interactie factor, Hsp90 = heat shock proteïne 90, Arnt = AhR nucleaire translocator, XRE = xenobiotisch respons element. Gebaseerd op Pocar *et al.*, 2003.

## Polygechlorineerde bifenylen

Polygechlorineerde bifenylen (PCBs) zijn een groep van aromatische verbindingen bestaande uit 209 'congeneren', waarbij het aantal en de plaats van de chlooratomen het congener-type bepalen. PCBs werden ongeveer 50 jaar lang geproduceerd tot eind de jaren '70 van de vorige eeuw (Meeker, 2010). Wegens hun niet-ontvlambaarheid en stabiliteit werden ze gebruikt voor allerlei doeleinden, onder meer in *transformators*, bij de productie van adhesieven, textielen en kunststoffen, in drukkerijen en als koelvloeistof (Boerjan *et al.*, 2002). Hoewel de productie van PCBs in vele landen verboden is, komen ze nog altijd in de natuur terecht omdat ze weglekken uit verouderde installaties of op een niet-correcte wijze worden afgevoerd (La Rocca en Mantovani, 2006).

Polygechlorineerde bifenylen kunnen op basis van hun werkingsmechanisme opgesplitst worden in twee groepen: dioxine gelijkende (coplanaire) en niet-dioxine gelijkende (niet-coplanaire) PCBs. Zoals de benaming zelf aangeeft, kunnen de dioxine gelijkende PCBs eveneens binden op de AhR en zijn hun effecten dus vergelijkbaar met deze veroorzaakt door dioxines. Studies geven ook aan dat enkel coplanaire PCBs een embryotoxische werking hebben bij verscheidene species (Kuchenhoff *et al.*, 1999; Pocar *et al.*, 2005). Over de endocrien versturende eigenschappen van niet-coplanaire PCBs heerst nog veel onduidelijkheid. Deels zouden deze verklaard kunnen worden door de werking van hun metabolieten: gehydroxyeerde PCB-metabolieten inhiberen namelijk sulfotransferase-enzymen, waardoor het gehalte van vrij oestradiol in het organisme toeneemt (Kester *et al.*, 2000). PCBs kunnen ook het schildklierhormoonmetabolisme verstoren (Miller *et al.*, 2009). Hoewel er nog geen maximumgehalten werden vastgelegd voor niet-coplanaire PCBs, is het vooral dit type PCBs dat in de voedselketen wordt aangetroffen (La Rocca en Mantovani, 2006).

## Vlamvertragers

Vlamvertragers zijn chemische verbindingen die gebruikt worden in polymeren, textiel, bouwmaterialen, meubels en elektrische installaties om de vuurbestendigheid ervan te verhogen (Vos *et al.*, 2003). De wereldwijde productie van vlamvertragers werd in 1992 geschat op meer dan 600 000 ton per jaar (IPCS, 1997). Bekende en veelgebruikte vlamvertragers zijn de broomhoudende varianten, zoals de polygebromineerde difenylethers (PBDEs), tetrabromobisfenol A (TBBP-A) en hexabromocyclo dodecaan (HBCD).

In tegenstelling tot bijvoorbeeld PCBs en DDT zijn de concentraties van enkele broomhoudende vlamvertragers, zoals PBDEs, in het milieu de laatste decennia sterk gestegen (Vos *et al.*, 2003). Humane blootstelling aan PBDEs gebeurt waarschijnlijk voornamelijk via het voedsel. Zo wordt de dagelijkse hoeveelheid PBDE-inname in België via het voedsel geschat op 23-48 ng/dag (Voorspoels *et al.*, 2007). Studies geven aan dat broomhoudende vlamvertragers in staat zijn het endocriene

systeem te beïnvloeden door te interageren met de schildklierhormoonhomeostase, de AhR en de oestrogenreceptor (Darnerud *et al.*, 2001; Meerts *et al.*, 2001). Doordat de meeste endocriene toxiciteitsstudies werden uitgevoerd met PBDEs, is de kennis over mogelijke endocriene stoornissen veroorzaakt door TBBP-A en HBCD op dit moment quasi onbestaande. In januari 2003 publiceerde het Europese Parlement een richtlijn waarin werd vermeld dat vanaf 1 juli 2006 geen elektrische en elektronische apparatuur meer op de markt mag worden gebracht waarin PBDEs zijn verwerkt (EC, 2003).

## Perfluoralkylverbindingen

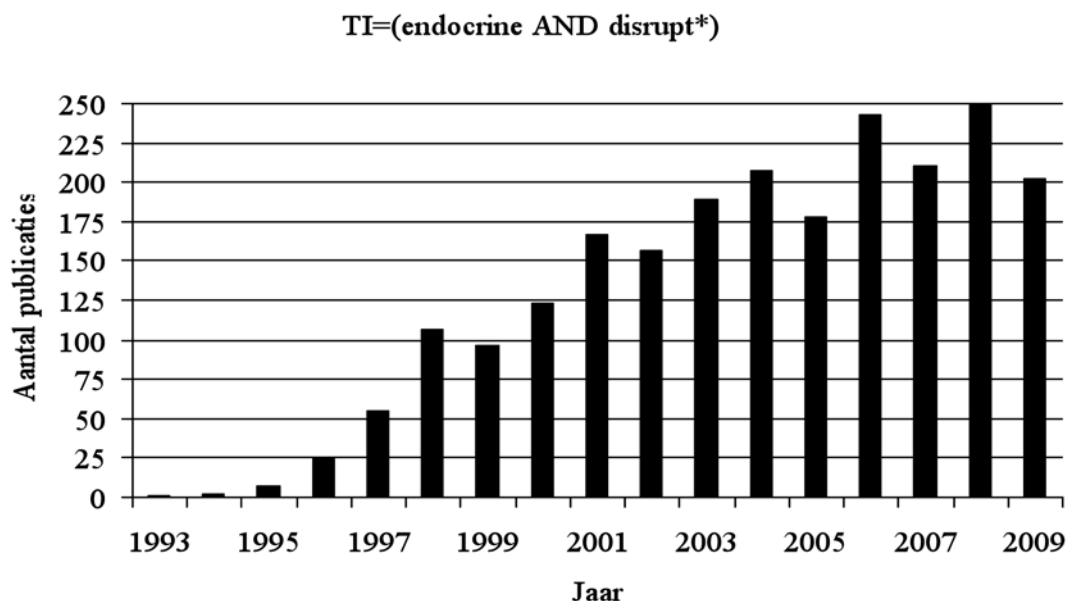
Een laatste groep chemicaliën die in deze groep thuishoren, zijn de perfluoralkylverbindingen. Zoals de naam laat vermoeden, zijn deze stoffen opgebouwd uit een koolstofskelet waaraan meerdere fluoratomen covalent zijn gebonden. De koolstof-fluorbinding is de sterkste covalente binding waardoor perfluoralkylverbindingen zeer stabiele en praktisch ondegradeerbare chemicaliën zijn. Perfluoralkylverbindingen worden gebruikt als surfactanten, polymeren en vuurbestendige schuimen in industriële en commerciële producten (Dauwe *et al.*, 2007). Perfluorooctaansulfonaat (PFOS), eindmetabool van de perfluoralkylverbindingen, werd reeds aangetoond bij onder meer zoogdieren, vissen en vogels over de hele planeet, waarbij de hoogste concentratie te vinden is in organismen die leven in dichtbevolkte en geïndustrialiseerde gebieden (Giesy en Kannan, 2001). In het lichaam binden perfluoralkylverbindingen aan serumproteïnen, zoals albumine (Han *et al.*, 2003). De lever blijkt het targetorgaan voor deze verbindingen te zijn (OECD, 2002).

Onderzoek heeft uitgewezen dat de toediening van hoge dosissen PFOS en perfluorooctaanzuur (PFOA) tumoren induceert en ook leidt tot een verstoorde ontwikkeling, endocriene verstoring en neonatale mortaliteit bij proefdieren (Betts, 2007). De onderliggende mechanismen die deze afwijkingen veroorzaken, zijn grotendeels nog onbekend. Een mogelijke verklaring is de binding van perfluoralkylverbindingen aan de reeds vernoemde PPARs (Abbott *et al.*, 2007). Het is echter waarschijnlijk dat deze verbindingen ook nog via andere biochemische processen de normale fysiologie kunnen verstoren.

## ENDOCRIENE VERSTOORDERS, EEN ONDERSCHAT PROBLEEM?

De afgelopen jaren werden endocriene verstoorders zowel via *in vivo* als in *in vitro* experimenten onderzocht. Allereerst toonden epidemiologische studies een verband aan tussen reproductieve stoornissen bij wildfauna en de blootstelling aan specifieke toxische stoffen, later endocriene verstoorders genoemd (Colborn *et al.*, 1993). Deze studies werden meestal uitgevoerd bij dieren waarbij reeds wijzigingen in de voortplanting werden vastgesteld. Meestal betrof het dieren die aan de top van de voedselketen stonden of leefden





**Figuur 3.** Aantal publicaties met *endocrine disrupt\** in de titel (web of science). De telling begint vanaf 1993, het jaar waarin de allereerste review over endocriene verstoring werd gepubliceerd (Colborn *et al.*, 1993). Een trapsgewijze stijging in het aantal publicaties is duidelijk zichtbaar. Het dient opgemerkt te worden dat artikels waarin de specifieke naam van de chemicaliën vermeld staat, niet werden opgenomen in de telling, waardoor het aantal gepubliceerde artikels over endocriene verstoring in realiteit veel groter is.

in een omgeving waar uitzonderlijke concentraties van EVs werden aangetroffen (Guillette *et al.*, 1994 ; Rhind, 2005). Een bekend voorbeeld hiervan zijn de alligators uit het Apokameer in Florida. Na jarenlang gebruik van pesticiden op aanpalende landbouwgebieden en door een lekkage van pesticiden op een nabijgelegen chemische site vertoonden de gonaden van deze dieren verscheidene morfologische afwijkingen (Milnes en Guillette, 2008). Zo werden multinucleaire oocyten en follikels met meerdere oocyten aangetroffen en was bij de mannelijke alligators de fallus kleiner dan bij dieren uit minder vervuilde meren. Bovendien werden een daling in de viabiliteit van de eieren en een daarop volgende terugval van het aantal jonge alligators vastgesteld.

Na deze vaststellingen in de natuur werd vervolgens in het labo gestart met blootstellingsexperimenten waarbij proefdieren werden blootgesteld aan bekende EV-concentraties om daarna eventuele afwijkingen te bestuderen en om verschillende toxiciteitslimieten van chemicaliën te bepalen, zoals de *no observed adverse effect level* en *lowest observed adverse effect level*, respectievelijk NOAEL en LOAEL (Chaffin *et al.*, 1997 ; Fisher *et al.*, 1999). Naast *in vivo* studies werden ook *in vitro* studies uitgevoerd waarbij verschillende celtypes werden blootgesteld aan EVs. Hierbij probeerde men de moleculaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de schadelijke invloed van EVs op te sporen en nieuwe EVs te identificeren (Todd *et al.*, 1995 ; Maras *et al.*, 2006 ; Vanparys *et al.*, 2006).

De aandacht voor de potentieel nefaste gevolgen van EVs op het welzijn en de gezondheid van mens en dier is de laatste jaren, zo blijkt uit het stijgend aantal publicaties, sterk toegenomen (Figuur 3). Lange tijd

heeft men echter het onderzoek naar EVs verwaarloosd omwille van verscheidene redenen. Zo werd initieel aangenomen dat EVs niet toxisch waren, vermits ze in het milieu voorkomen in zeer lage concentraties (IEH, 1999), ver beneden de concentraties die bij acute toxiciteitstesten schadelijke fysiologische gevolgen hebben. Bovendien is de productie van enkele bekende EVs, zoals DDT en PCBs, al verboden sinds de jaren '60 en '70 van de vorige eeuw (Walker, 2001 ; Rhind, 2005). Daarenboven werden in de natuur enkel afwijkingen gesignaleerd bij die dieren die leefden in een omgeving met uitzonderlijk hoge EV-concentraties (Colborn *et al.*, 1993 ; Guillette *et al.*, 1994). Ten slotte hebben EVs een veel lagere affiniteit voor de oestrogenreceptor dan de natuurlijke oestrogenen, waardoor EVs minder biologisch potent zijn dan oestradiol en andere oestrogenen (Rhind, 2005).

Wanneer echter dieper wordt ingegaan op de eigenschappen van endocriene verstoorders, wordt duidelijk dat in het verleden het onderzoek naar de mogelijk schadelijke gevolgen van deze verbindingen misschien wel op een te oppervlakkige wijze werd benaderd. Vele EVs hebben een halfwaardetijd van meerdere jaren waardoor ze, ondanks hun lage concentraties, gedurende lange tijd in het milieu aanwezig blijven (Colborn *et al.*, 1993 ; Pocar *et al.*, 2003). De productie van DDT en PCBs mag dan in vele landen al tientallen jaren verboden zijn, toch worden deze stoffen wegens hun lange halfwaardetijd nog steeds aangetroffen in het milieu (Chu *et al.*, 2003 ; Voorspoels *et al.*, 2004). Alle EVs hebben een zeer lipofiel karakter waardoor ze accumuleren in vetweefsel (Brevini *et al.*, 2005). Bij zoogdieren worden tijdens de lactatie grote hoeveelheden vet gemobiliseerd (Sweeney, 2002). Daardoor bestaat de mogelijkheid dat tijdens

deze fase het moederdier, en via de moedermelk ook de neonat, aan hogere, mogelijk schadelijke EV-concentraties worden blootgesteld. Door de combinatie van de lange halfwaardetijd van EVs en hun lipofiliteit wordt een bioaccumulatie-effect in de voedselketen waargenomen. De hoogste EV-concentraties worden gedetecteerd bij dieren aan de top van de voedselketen. In het lichaam vertonen EVs bovendien een grotere biobeschikbaarheid en verdeling in het lichaam dan de endogene geslachtshormonen aangezien ze, in tegenstelling tot deze geslachtshormonen, een lage affiniteit bezitten voor de bindingsproteïnen in het bloed (Dechaud *et al.*, 1999 ; Nagel *et al.*, 1999). Mens en dier worden blootgesteld aan voortdurend veranderende complexe mengsels van EVs. Het is niet ondenkbaar dat deze stoffen in staat zijn elkaars werking op een tegengestelde, additieve of synergistische manier te beïnvloeden. Bij de toediening van EV-mengsels in omgevingsrelevante concentraties blijkt zelfs dat de schadelijke dosissen ervan beduidend lager liggen dan wanneer individuele verbindingen worden toegediend (Rajapakse *et al.*, 2002). Metabolieten van EVs kunnen een hogere endocriene activiteit vertonen dan de originele verbindingen (Kester *et al.*, 2000; Meerts *et al.*, 2001). Met deze metabolieten wordt echter geen rekening gehouden wanneer tijdens *in vitro* experimenten originele verbindingen worden toegediend. Meer nog, de *in vivo* metabolisatie is voor vele verbindingen dikwijls nog niet bekend en is bovendien speciesafhankelijk (Boerjan *et al.*, 2002). Endocriene verstoorders blijken ook transgeneratie-effecten te veroorzaken. Daarbij worden de gevolgen van de blootstelling aan EVs overgedragen naar de volgende generatie(s). In de meeste van deze transgeneratiestudies worden de mogelijke schadelijke effecten van deze EVs tot aan de F1-generatie onderzocht (Wolf *et al.*, 1999 ; Parks *et al.*, 2000 ; Schwaiger *et al.*, 2002), maar recente data suggereren dat de toediening van de pesticiden vinclozoline en metoxychlor aan drachtige ratten zorgde voor een verhoogde apoptosegraad van spermatogene cellen, een daling van het aantal spermacellen en van de motiliteit ervan bij de mannelijke nakomelingen tot in de F4-generatie (Anway *et al.*, 2005). De geobserveerde effecten worden mogelijk veroorzaakt door een wijziging van het epigenetisch DNA-patroon. Het epigenoom is het totaal van moleculaire mechanismen, zoals DNA-methylatie en covalente wijzigingen van histonenproteïnen, die de genexpressie controleren zonder wijzigingen in de DNA-sequentie aan te brengen (Skinner, 2007). Verder zijn er studies voorhanden die stellen dat een chronische blootstelling aan meer omgevingsrelevante EV-concentraties dezelfde, of zelfs meer schadelijke effecten kan induceren dan een acute blootstelling aan uitzonderlijk hoge EV-concentraties (Borman *et al.*, 2000). Aangezien in het verleden voornamelijk acute toxiciteitstesten werden uitgevoerd en men dus het effect van EVs op lange termijn heeft onderschat, bestaat de kans dat de huidige regelgeving omtrent de maximaal toegelaten EV-concentraties berust op een onvolledige of onjuiste kennis. Om onder andere dit probleem te verhelpen heeft de Europese

Unie het REACH-project goedgekeurd, waarmee het zich verplicht om een hele groep bestaande en nieuwe chemicaliën te onderwerpen aan een nieuwe, volledige toxicologische doorlichting (EC, 2007).

## ENDOCRIENE VERSTOORDERS EN HUN MOGELIJKE EFFECTEN OP NUTSDIEREN

Literatuurgegevens over potentieel schadelijke effecten van endocriene verstoorders op nutsdieren zijn zeer schaars (Boerjan *et al.*, 2002). Nochtans is de kans reëel dat deze dieren via voedsel en/of drinkwater aan EVs worden blootgesteld. Een van de weinige zekerheden in dit onderzoeksveld is het schadelijke effect van een te grote opname van fyto-oestrogenen door herkauwers. De effecten van fyto-oestrogenen werden reeds in 1946 beschreven bij schapen die in klaverrijke weiden graasden. Deze schapen vertoonden allerlei reproductiestoornissen, waaronder een gedaald geboortecijfer en uterusprolaps (Bennetts *et al.*, 1946). Later werd vastgesteld dat ook rundvee vatbaar is voor de effecten van fyto-oestrogenen (Adler en Trainin, 1960). Koeien vertoonden onder andere een gezwollen vulva, afscheiding van cervixslijm, een vergrote uterus en onregelmatige oestruscycli met perioden van anoestrus en verlaagde bevruchtingscijfers. Zowel bij schapen als koeien verdwenen deze effecten nadat de dieren werden verplaatst naar weiden waarop geen fyto-oestrogenbevattende planten groeiden. Bij schapen kunnen de gevolgen echter blijvend zijn wanneer ze langer dan drie jaar worden blootgesteld aan deze planten (Adams, 1995). Nutsdieren blijken ook gevoelig te zijn voor zearalenone (Minervini en Dell'Aquila, 2008). Zeugen gevoederd met door zearalenone gecontamineerd voedsel vertonen bijvoorbeeld een verlengd interoestrusinterval (Edwards *et al.*, 1987). Bovendien zijn varkens en schapen vatbaarder dan knaagdieren voor de effecten van zearalenone aangezien de NOAEL van deze laatste groep tijdens blootstellingsexperimenten hoger blijkt te liggen dan bij varkens en schapen (Zinedine *et al.*, 2007). Bij koeien worden infertiliteit, een verminderde melkproductie en hyperoestrogenisme ook gelinkt aan de blootstelling aan zearalenone (D'Mello *et al.*, 1999). Noch zearalenone noch de metabolieten ervan kunnen echter aangetoond worden in de spieren, de nieren, de lever, de blaas of in het dorsaal vet van stieren gevoederd met een 0,1mg zearalenone/dag/kg gecontamineerd dieet (Dänicke *et al.*, 2002). Onderzoek bij schapen heeft aangetoond dat de verspreiding van rioolslib op landbouwgronden als bemesting zorgt voor een duidelijke verstoring in de ontwikkeling van zowel de ovaria als de testes bij de foetus (Paul *et al.*, 2005; Fowler *et al.*, 2008). Daarenboven hebben koeien die van oppervlaktewater drinken dat gecontamineerd is met rioolslib, een lagere melkproductie en een hogere leeftijd bij de eerste kalving (Meijer *et al.*, 1999).

De laatste jaren werden ook *in vitro* experimenten uitgevoerd om de rechtstreekse schadelijke invloed van (mogelijke) EVs op de gameten van nutsdieren na te gaan. De blootstelling van bovine en porcine cu-



mulus-oocytcomplexen tijdens de *in vitro* maturatieperiode aan respectievelijk Aroclor 1254 (een PCB-mengsel) en een mix van chloorhoudende organische chemicaliën gaf aanleiding tot een verstoring van zowel de maturatie van de oocyten als de verdere embryonale ontwikkeling (Campagna *et al.*, 2001; Pocar *et al.*, 2001). Bovendien had deze chemicaliënmix ook een mindere motiliteit en viabiliteit, een verhoogde capaciteitsgraad, het ontstaan van spontane acrosomreacties en een gestegen calciumconcentratie in het cytosol bij porciene spermatozoa tot gevolg (Campagna *et al.*, 2009). Porciene granulosa-cellen blijken ook vatbaar te zijn voor de invloed van endocriene verstoorders aangezien de steroïdeproductie verstoord wordt na blootstelling aan BPA (Mlynarcikova *et al.*, 2005). Aangezien de primordiale geslachtscellen reeds in het foetaal stadium aanwezig zijn, bestaat de kans dat deze cellen op een chronische wijze worden blootgesteld aan EVs. Bovendien valt bij een aantal nutsdieren de lactatiepiek samen met het tijdstip waarop

men een nieuwe dracht tracht te bekomen (Leroy *et al.*, 2008). Het is dus goed mogelijk dat de eventueel vrijgestelde EVs tijdens de lactatie een negatieve invloed hebben op de kwaliteit van de geovuleerde eicel en op het embryo met een gestoorde dracht tot gevolg. Onderzoek heeft overigens aangetoond dat embryo's en foetussen gevoeliger zijn voor EVs dan adulte dieren (Boerjan *et al.*, 2002; Sweeney, 2002; Brevini *et al.*, 2005).

Bij *in vitro* onderzoek is het echter zeer belangrijk om in de mate van het mogelijke de *in vivo* situatie na te bootsen. Betrouwbare en recente data over de aanwezigheid en concentratie van EVs in verschillende weefseltypen en lichaamsvloeistoffen van nutsdieren zijn daarom onontbeerlijk, maar momenteel echter zeer zeldzaam (Boerjan *et al.*, 2002; Hirako *et al.*, 2005; Rhind, 2005). De behoefte aan descriptieve studies aangaande deze concentraties is dus van groot belang om een gestructureerde mening te formuleren over de mogelijke invloed van EVs op de fertiliteit van

**Tabel 1. Concentratie (mediaan of range) van endocriene verstoorders in weefsels of lichaamsvochten van nutsdieren.**

Species	Weefsel	Chemische verbinding	Concentratie	Jaar staalname	Land	Referentie
Kalf	Lever	CB 153	10,5 ng/g ww 15,3 ng/g ww	2006 2006	Asturië, Spanje Galicië, Spanje	Blanco-Penedo <i>et al.</i> , 2009
Rund	Follikelvocht	HCB p,p'-DDE Som PCBs	1,77 ng/ml 1,50 ng/ml 3,05 ng/ml	?	Griekenland	Kamarianos <i>et al.</i> , 2003
Rund	Spier	Som PBDEs	< 20 pg/g ww	2005	België	Voorspoels <i>et al.</i> , 2007
Rund	Vet	CB 153 HCB p,p'-DDE	1,8 ng/g lw 2,7 ng/g lw 2,4 ng/g lw	2004	Zweden	Glynn <i>et al.</i> , 2009
Schaap	Follikelvocht	Som PCBs HCB p,p'-DDE	1,25 ng/ml 0,73 ng/ml 2,97 ng/ml	?	Griekenland	Kamarianos <i>et al.</i> , 2003
Schaap	Lever Spier Niervet	Alkylfenolen Ftalaten	< 10- 400 µg/kg > 20 000 µg/kg	?	Groot-Brittannië	Rhind, 2005
Varken	Follikelvocht	Som PCBs HCB p,p'-DDE	0,78 ng/ml 0,80 ng/ml 0,45 ng/ml	?	Griekenland	Kamarianos <i>et al.</i> , 2003
Varken	Lever	Som PCBs p,p'-DDE	27,8-145,9 ng/g lw 12,7-27,6 ng/g lw	?	Roemenië	Covaci <i>et al.</i> , 2004
Varken	Vet	Som PCBs p,p'-DDE	38,4-176,3 ng/g lw 2,6-6,3 ng/g lw	?	Roemenië	Covaci <i>et al.</i> , 2004
Varken	Vet	CB 153 DDE	0,5 ng/g lw 0,5 ng/g lw	2004	Zweden	Glynn <i>et al.</i> , 2009

ww = wet gewicht, concentratie in functie van het totaalgewicht van het weefsel  
lw = lipid gewicht, concentratie in functie van het vetgehalte van het weefsel

nutsdieren. Uit de weinige data die voorhanden zijn (Tabel 1), blijkt dat de detecteerbare EVs in verscheidene Europese landen in dezelfde grootteorde liggen (Kamarianos *et al.*, 2003; Covaci *et al.*, 2004; Rhind, 2005; Voorspoels *et al.*, 2007; Blanco-Penedo *et al.*, 2008; Glynn *et al.*, 2009). Ten slotte is onderzoek naar de mogelijk schadelijke invloed van EVs op nutsdieren uitermate belangrijk voor de algemene volksgezondheid aangezien de consument via dierlijke producten en afgeleiden blootgesteld kan worden aan EVs.

## CONCLUSIE

Endocriene verstoorders zijn verbindingen die in staat zijn het endocriene systeem van mens en dier te beïnvloeden. Door hun relatief lage omgevingsconcentratie en veelal chronische toxiciteit zijn de dikwijls subtiele effecten van deze verbindingen jarenlang onopgemerkt gebleven. Regelmatig worden echter nieuwe werkingsmechanismen van deze stoffen aan het licht gebracht. Het onderzoek naar endocriene verstoorders is complex, aangezien deze verbindingen in de natuur voorkomen als mengsels van originele en gemetaboliseerde verbindingen die additief, tegengesteld of synergistisch kunnen werken. Een doordachte experimentele *in vitro* set-up is dus onontbeerlijk. Studies over de eventuele betrokkenheid van endocriene verstoorders bij reproductieproblemen van nutsdieren zijn weinig voorhanden. Bovendien zijn ook gegevens over de *in vivo* concentraties van deze verbindingen zeer zeldzaam. Een eerste stap naar een duidelijke risicoanalyse over het eventueel causaal verband tussen endocriene verstoorders en reproductieproblemen van nutsdieren is dus het verzamelen van informatie over de contaminatie van de veestapel met dergelijke verstoorders.

## REFERENTIES

- Abbott B.D., Wolf C.J., Schmid J.E., Das K.P., Zehr R.D., Helfant L., Nakayama S., Lindstrom A.B., Strynar M.J., Lau C. (2007). Perfluorooctanoic acid-induced developmental toxicity in the mouse is dependent on expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *Toxicological Sciences* 98, 571-581.
- Adams N.R. (1995). Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science* 73, 1509-1515.
- Adler J.H., Trainin D. (1960). A hyperoestrogenic syndrome in cattle. *Refuah Vet* 17, 115-122.
- Ahel M., Giger W., Koch M. (1994). Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment -I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research* 28, 1131-1142.
- Anway M.D., Cupp A.S., Uzumcu M., Skinner M.K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and mate fertility. *Science* 308, 1466-1469.
- Baber R. (2010). Phytoestrogens and post reproductive health. *Maturitas* 66, 344-349.
- Bennett J.W., Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 497-516.
- Bennetts H.W., Underwood E.J., Shier F.L. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Australian Veterinary Journal* 22, 2-12.
- Bernard A., Broeckaert F., De Poorter G., De Cock A., Hermans C., Houins G., Saegermans C., Hallet L. (2001). De PCB/dioxine vergiftiging in België (1999): analyse van de voedselketencontaminatie en evaluatie van de gezondheidsrisico's. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 70, 81-87.
- Betts K.S. (2007). Perfluoroalkyl acids - What is the evidence telling us? *Environmental Health Perspectives* 115, A250-A256.
- Blanco-Penedo I., Lopez-Alonso M., Miranda M., Benedito J., Shore R.F. (2008). Organochlorine Pesticide and Polychlorinated Biphenyl in Calves from North-West Spain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 583-587.
- Boberg J., Taxvig C., Christiansen S., Hass U. (2010). Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology* 30, 301-312.
- Bock K.W., Kohle C. (2006). Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochemical Pharmacology* 72, 393-404.
- Boerjan M.L., Freijnagel S., Rhind S.M., Meijer G.A.L. (2002). The potential reproductive effects of exposure of domestic ruminants to endocrine disrupting compounds. *Animal Science* 74, 3-12.
- Borman S.M., Christian P.J., Sipes I.G., Hoyer P.B. (2000). Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: Comparison through calculation of an ovotoxic index. *Toxicology and Applied Pharmacology* 167, 191-198.
- Bretveld R.W., Thomas C.M.G., Scheepers P.T.J., Zielhuis G.A., Roeleveld N. (2006). Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 30.
- Brevini T.A.L., Cillo F., Antonini S., Gandolfi F. (2005). Effects of endocrine disrupters on the oocytes and embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals* 40, 291-299.
- Brotans J.A., Oleaserrano M.F., Villalobos M., Pedraza V., Olea N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environmental Health Perspectives* 103, 608-612.
- Butler W.R. (1998). Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 81, 2533-2539.
- Byford J.R., Shaw L.E., Drew M.G.B., Pope G.S., Sauer M.J., Darbre P.D. (2002). Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80, 49-60.
- Caliman F.A., Gavrilescu M. (2009). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - a review. *Clean* 37, 277-303.
- Campagna C., Sirard M.A., Ayotte P., Bailey J.L. (2001). Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture. *Biology of Reproduction* 65, 554-560.
- Campagna C., Guillemette C., Ayotte P., Bailey J.L. (2009). Effects of an environmentally relevant organochlorine mixture and a metabolized extract of this mixture on porcine sperm parameters in vitro. *Journal of Andrology* 30, 317-324.

- Chadwick L.R., Pauli G.F., Farnsworth N.R. (2006). The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine* 13, 119-131.
- Chaffin C.L., Trewin A.L., Watanabe G., Taya K., Hutz R.J. (1997). Alterations to the pituitary-gonadal axis in the peripubertal female rat exposed in utero and through lactation to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biology of Reproduction* 56, 1498-1502.
- Chen J., Ahn K.C., Gee N.A., Gee S.J., Hammock B.D., Lasley B.L. (2007). Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221, 278-284.
- Chu S.G., Covaci A., Schepens P. (2003). Levels and chiral signatures of persistent organochlorine pollutants in human tissues from Belgium. *Environmental Research* 93, 167-176.
- Chung K.Y., Johnson B.J. (2009). Melengestrol acetate enhances adipogenic gene expression in cultured muscle-derived cells. *Journal of Animal Science* 87, 3897-3904.
- Colborn T., Saal F.S.V., Soto A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101, 378-384.
- Cos P., De Bruyne T., Apers S., Berghe D.V., Pieters L., Vlietinck A.J. (2003). Phytoestrogens: Recent developments. *Planta Medica* 69, 589-599.
- Covaci A., Gheorghe A., Schepens P. (2004). Distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and alpha-HCH enantiomers in pork tissues. *Chemosphere* 56, 757-766.
- CRV (2010). CRV Jaarstatistieken Vlaanderen 2009.
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C. (1999). Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80, 183-205.
- Dänicke S., Gadeken D., Ueberschar K.H., Meyer U., Scholz H. (2002). Effects of fusarium toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone. *Archives of Animal Nutrition-Archiv für Tierernährung* 56, 245-261.
- Darbre P.D., Harvey P.W. (2008). Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology* 28, 561-578.
- Darnerud P.O., Eriksen G.S., Johannesson T., Larsen P.B., Viluksela M. (2001). Polybrominated diphenyl ethers: Occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental Health Perspectives* 109, 49-68.
- Dauwe T., Van de Vijver K., De Coen W., Eens M. (2007). PFOS levels in the blood and liver of a small insectivorous songbird near a fluorochemical plant. *Environment International* 33, 357-361.
- Dechaud H., Ravard C., Claustrat F., de la Perriere A.B., Puget M. (1999). Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 64, 328-334.
- EC (2000). Working document on sludge, 3<sup>rd</sup> draft. *ENVE.3/LM*.
- EC (2003). Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment. *Official Journal of the European Union* L37, 19-23.
- EC (2007). REACH in brief.
- Edwards S., Cantley T.C., Rottinghaus G.E., Osweiler G.D., Day B.N. (1987). The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. *Theriogenology* 28, 43-49.
- Fahey J., O'Sullivan K., Crilly J., Mee J.F. (2002). The effect of feeding and management practices on calving rate in dairy herds. *Animal Reproduction Science* 74, 133-150.
- FAVV (2002). Advies 2002/14 - Sanitaire veiligheid van het gebruik van zuiveringszand in de landbouw.
- Fink-Gremmels J., Malekinejad H. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology* 137, 326-341.
- Fisher J.S., Turner K.J., Brown D., Sharpe R.M. (1999). Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environmental Health Perspectives* 107, 397-405.
- Fowler P.A., Dora N.J., McFerran H., Amezaga M.R., Miller D.W., Lea R.G., Cash P., McNeilly A.S., Evans N.P., Cotinot C., Sharpe R.M., Rhind S.M. (2008). In utero exposure to low doses of environmental pollutants disrupts fetal ovarian development in sheep. *Molecular Human Reproduction* 14, 269-280.
- Gandolfi F., Pocar P., Brevini T.A.L., Fischer B. (2002). Impact of endocrine disrupters on ovarian function and embryonic development. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 189-201.
- Giesy J.P., Kannan K. (2001). Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environmental Science & Technology* 35, 1339-1342.
- Glynn A., Aune M., Nilsson I., Darnerud P.O., Ankarberg E.H., Bignert A., Nordlander I. (2009). Declining levels of PCB, HCB and p,p'-DDE in adipose tissue from food producing bovines and swine in Sweden 1991-2004. *Chemosphere* 74, 1457-1462.
- Guillette L.J., Gross T.S., Masson G.R., Matter J.M., Percival H.F., Woodward A.R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* 102, 680-688.
- Han X., Snow T.A., Kemper R.A., Jepson G.W. (2003). Binding of perfluorooctanoic acid to rat and human plasma proteins. *Chemical Research in Toxicology* 16, 775-781.
- Harris C.A., Sumpter J.P. (2001). The endocrine disrupting potential of phthalates. In: Metzler M. and Hutzinger O. (editors). *The Handbook of Environmental Chemistry 3L: Endocrine Disruptors Part I*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 169-201.
- Helleday T., Tuominen K.L., Bergman A., Jenssen D. (1999). Brominated flame retardants induce intragenic recombination in mammalian cells. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 439, 137-147.
- Hirako M., Aoki M., Kimura K., Hanafusa Y., Ishizaki H., Kariya Y. (2005). Comparison of the concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in maternal and fetal blood, amniotic and allantoic fluids in cattle. *Reproductive Toxicology* 20, 247-254.
- IEH (1999). IEH assessment of the ecological significance of endocrine disruption: Effects on reproductive function



- and consequences for natural populations (assessment A4).
- IPCS (1997). Environmental Health Criteria 192. Flame retardants: A general introduction.
- Jobling S., Tyler C.R. (2003). Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure and Applied Chemistry* 75, 2219-2234.
- Kamarianos A., Karamanlis X., Goulas P., Theodosiadou E., Smokovitis A. (2003). The presence of environmental pollutants in the follicular fluid of farm animals (cattle, sheep, goats, and pigs). *Reproductive Toxicology* 17, 185-190.
- Kang J.H., Katayama Y., Kondo F. (2006). Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Toxicology* 217, 81-90.
- Kester M.H.A., Bulduk S., Tibboel D., Meinel W., Glatt H., Falany C.N., Coughtrie M.W.H., Bergman A., Safe S.H., Kuiper G.G.J.M., Schuur A.G., Brouwer A., Visser T.J. (2000). Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: A novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology* 141, 1897-1900.
- Klein K.O. (1998). Isoflavones, soy-based infant formulas, and relevance to endocrine function. *Nutrition Reviews* 56, 193-204.
- Kuchenhoff A., Eckard R., Buff K., Fischer B. (1999). Stage-specific effects of defined mixtures of polychlorinated biphenyls on in vitro development of rabbit preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 54, 126-134.
- Kuiper G.G.J.M., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., van der Burg P., Gustafsson J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- La Guardia M.J., Hale R.C., Harvey E., Mainor T.M. (2001). Alkylphenol ethoxylate degradation products in land-applied sewage sludge (biosolids). *Environmental Science & Technology* 35, 4798-4804.
- La Rocca C., Mantovani A. (2006). From environment to food: the case of PCB. *Annali dell'istituto superiore di sanita* 42, 410-416.
- Larsen J.C. (2006). Risk assessments of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in food. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, 885-896.
- Latini G., Del Vecchio A., Massaro M., Verrotti A., De Felice C. (2006). Phthalate exposure and male infertility. *Toxicology* 226, 90-98.
- Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., de Kruif A., Genicot G., Van Soom A. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130, 485-495.
- Leroy J.L.M.R., Opsomer G., Van Soom A., Goovaerts I.G.F., Bols P.E.J. (2008). Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I - The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 612-622.
- Lim D.S., Kwack S.J., Kim K.B., Kim H.S., Lee B.M. (2009). Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 72, 1285-1291.
- Liney K.E., Hagger J.A., Tyler C.R., Depledge M.H., Galloway T.S., Jobling S. (2006). Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. *Environmental Health Perspectives* 114, 81-89.
- Lovekamp-Swan T., Davis B.J. (2003). Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environmental Health Perspectives* 111, 139-145.
- Maffini M.V., Rubin B.S., Sonnenschein C., Soto A.M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. *Molecular and Cellular Endocrinology* 254, 179-186.
- Mandal P.K. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of Comparative Physiology B* 175, 221-230.
- Maras M., Vanparys C., Muylle F., Robbens J., Berger U., Barber J.L., Blust R., De Coen W. (2006). Estrogen-like properties of fluorotelomer alcohols as revealed by MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Environmental Health Perspectives* 114, 100-105.
- Markey C.M., Michaelson C.L., Sonnenschein C., Soto A.M. (2001). Alkylphenols and bisphenol A as environmental estrogens. In: Metzler M. en Hutzinger O. (editors). *The Handbook of Environmental Chemistry 3L: Endocrine Disruptors Part I*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 129-153.
- Meeker J.D. (2010). Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health. *Maturitas* 66, 236-241.
- Meerts I.A.T.M., Letcher R.J., Hoving S., Marsh G., Bergman A., Lemmen J.G., van der Burg B., Brouwer A. (2001). In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental Health Perspectives* 109, 399-407.
- Meijer G.A.L., de Bree J., Wagenaar J.A., Spoelstra S.F. (1999). Sewerage overflows put production and fertility of dairy cows at risk. *Journal of Environmental Quality* 28, 1381-1383.
- Miller M.D., Crofton K.M., Rice D.C., Zoeller R.T. (2009). Thyroid-disrupting chemicals: Interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Environmental Health Perspectives* 117, 1033-1041.
- Milnes M.R., Guillette L.J. (2008). Alligator tales: New lessons about environmental contaminants from a sentinel species. *Bioscience* 58, 1027-1036.
- Minervini F., Dell'Aquila M.E. (2008). Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 2570-2584.
- Mlynarcikova A., Kolena J., Fickova M., Scsukova S. (2005). Alterations in steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells caused by bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate. *Molecular and Cellular Endocrinology* 244, 57-62.
- Montgomery-Brown J., Reinhard M. (2003). Occurrence and behavior of alkylphenol polyethoxylates in the environment. *Environmental Engineering Science* 20, 471-486.
- Moriyama K., Tagami T., Akamizu T., Usui T., Saijo M., Kanamoto N., Hataya Y., Shimatsu A., Kuzuya H., Nakao K. (2002). Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 5185-5190.
- Nagel S.C., vom Saal F.S., Welshons W.V. (1999). Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 69, 343-357.

- NTP (1982). Carcinogenicity bioassay of zearalenone in F344/N rats and F6C3F1 mice. *National Toxicology Program Technical Reports Series* 235.
- OECD (2002). Co-operation on existing chemicals. Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts. *ENV/JM/RD(2002)17/FINAL*.
- Okubo T., Yokoyama Y., Kano K., Kano I. (2001). ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR. *Food and Chemical Toxicology* 39, 1225-1232.
- Opsomer G., Coryn M., Deluyker H., de Kruif A. (1998). An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reproduction in Domestic Animals* 33, 193-204.
- Overk C.R., Guo J., Chadwick L.R., Lantvit D.D., Minassi A., Appendino G., Chen S.N., Lankin D.C., Farnsworth N.R., Pauli G.F., van Breemen R.B., Bolton J.L. (2008). In vivo estrogenic comparisons of *Trifolium pratense* (red clover) *Humulus lupulus* (hops), and the pure compounds isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. *Chemico-Biological Interactions* 176, 30-39.
- Parks L.G., Ostby J.S., Lambright C.R., Abbott B.D., Klinefelter G.R., Barlow N.J., Gray L.E. (2000). The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicological Sciences* 58, 339-349.
- Paul C., Rhind S.M., Kyle C.E., Scott H., McKinnell C., Sharpe R.M. (2005). Cellular and hormonal disruption of fetal testis development in sheep reared on pasture treated with sewage sludge. *Environmental Health Perspectives* 113, 1580-1587.
- Pocar P., Perazzoli F., Luciano A.M., Gandolfi F. (2001). In vitro reproductive toxicity of polychlorinated biphenyls: Effects on oocyte maturation and developmental competence in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 58, 411-416.
- Pocar P., Brevini T.A.L., Fischer B., Gandolfi F. (2003). The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction* 125, 313-325.
- Pocar P., Fischer B., Klönisch T., Hombach-Klönisch S. (2005). Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction. *Reproduction* 129, 379-389.
- Pocar P., Brevini T.A.L., Antonini S., Gandolfi F. (2006). Cellular and molecular mechanisms mediating the effect of polychlorinated biphenyls on oocyte in vitro maturation. *Reproductive Toxicology* 22, 242-249.
- Prusakiewicz J.J., Harville H.A., Zhang Y.H., Ackermann C., Voorman R.L. (2007). Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: Possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology* 232, 248-256.
- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* 8, 275-285.
- Rajapakse N., Silva E., Kortenkamp A. (2002). Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental Health Perspectives* 110, 917-921.
- Rhind S.M. (2005). Are endocrine disrupting compounds a threat to farm animal health, welfare and productivity? *Reproduction in Domestic Animals* 40, 282-290.
- Schiffer B., Daxenberger A., Meyer K., Meyer H.H.D. (2001). The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promoters in cattle: Environmental studies. *Environmental Health Perspectives* 109, 1145-1151.
- Schwaiger J., Mallow U., Ferling H., Knoerr S., Braunbeck T., Kalbfus W., Negele R.D. (2002). How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquatic Toxicology* 59, 177-189.
- Shier W.T., Shier A.C., Xie W., Mirocha C.J. (2001). Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon* 39, 1435-1438.
- Shrestha H.K., Nakao T., Suzuki T., Higaki T., Akita M. (2004). Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cows. *Theriogenology* 61, 1559-1571.
- Skinner M.K. (2007). Endocrine disruptors and epigenetic transgenerational disease etiology. *Pediatric Research* 61, 48R-50R.
- Snijders S.E.M., Dillon P., O'Callaghan D., Boland M.P. (2000). Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 53, 981-989.
- Stillerman K.P., Mattison D.R., Giudice L.C., Woodruff T.J. (2008). Environmental exposures and adverse pregnancy outcomes: A review of the science. *Reproductive Sciences* 15, 631-650.
- Stopper H., Schmitt E., Kobras K. (2005). Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutation Research* 574, 139-155.
- Sweeney T. (2002). Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Domestic Animal Endocrinology* 23, 203-209.
- Taxvig C., Vinggaard A.M., Hass U., Axelstad M., Boberg J., Hansen P.R., Frederiksen H., Nellemann C. (2008). Do parabens have the ability to interfere with steroidogenesis? *Toxicology Letters* 180, S42-S42.
- Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D., Servos M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of The Total Environment* 228, 87-87.
- Todd M.D., Lee M.J., Williams J.L., Nalezny J.M., Gee P., Benjamin M.B., Farr S.B. (1995). The CAT-Tox (L) assay - A sensitive and specific measure of stress-induced transcription in transformed human liver cells. *Fundamental and Applied Toxicology* 28, 118-128.
- Vanparys C., Maras M., Lenjou M., Robbens J., Van Bockstaele D., Blust R., De Coen W. (2006). Flow cytometric cell cycle analysis allows for rapid screening of estrogenicity in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology in Vitro* 20, 1238-1248.
- Vinggaard A.M., Hnida C., Breinholt V., Larsen J.C. (2000). Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicology in Vitro* 14, 227-234.
- vom Saal F.S., Hughes C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 113, 926-933.
- Voorspoels S., Covaci A., Maervoet J., De Meester I., Schepens P. (2004). Levels and profiles of PCBs and OCPs in marine benthic species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary. *Marine Pollution Bulletin* 49, 393-404.

- Voorspoels S., Covaci A., Neels H., Schepens P. (2007). Dietary PBDE intake: A market-basket study in Belgium. *Environment International* 33, 93-97.
- Vos J.G., Becher G., van den Berg M., de Boer J., Leonards P.E.G. (2003). Brominated flame retardants and endocrine disruption. *Pure and Applied Chemistry* 75, 2039-2046.
- Walker C.H. (2001). The organochlorine insecticides. In: Walker C.H. (editors). *Organic Pollutants: an Ecotoxicological Perspective*. 1<sup>st</sup> ed., Taylor & Francis Inc, New York, p. 91-120.
- Welshons W.V., Nagel S.C., vom Saal F.S.V. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol a at levels of human exposure. *Endocrinology* 147, S56-S69.
- White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135, 175-182.
- WHO (2006). WHO gives indoor use of DDT a clean bill of health for controlling malaria.
- Wilson V.S., Lambright C., Ostby J., Gray L.E. (2002). In vitro and in vivo effects of 17 beta-trenbolone: A feedlot effluent contaminant. *Toxicological Sciences* 70, 202-211.
- Wolf C.J., Ostby J.S., Gray L.E. (1999). Gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) severely alters reproductive function of female hamster offspring. *Toxicological Sciences* 51, 259-264.
- Wozniak A.L., Bulayeva N.N., Watson C.S. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca<sup>2+</sup> fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environmental Health Perspectives* 113, 431-439.
- Ying G.G., Williams B., Kookana R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environment International* 28, 215-226.
- Yu Z.L., Zhang L.S., Wu D.S., Liu F.Y. (2005). Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 441-446.
- Zanoli P., Zavatti M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 383-396.
- Zinedine A., Soriano J.M., Molto J.C., Manes J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1-18.