



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Influencias del Ambiente Hormonal Intraútero en la  
Distancia Anogenital en Mujeres Jóvenes

**Dña. M<sup>a</sup> Pilar Mira Escolano  
2015**





# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **FACULTAD DE MEDICINA**

### **TESIS DOCTORAL**

**"INFLUENCIAS DEL AMBIENTE HORMONAL INTRAÚTERO EN LA  
DISTANCIA ANOGENITAL EN MUJERES JÓVENES."**

**M<sup>a</sup> PILAR MIRA ESCOLANO**

**Directores: Dr. D. ALBERTO MANUEL TORRES CANTERO, Dr. D. JAIME  
MENDIOLA OLIVARES y Dr. D. JOSÉ JUAN LÓPEZ ESPÍN**

**Murcia, Julio de 2015**

**Programa de Doctorado en Salud Pública**



## **AGRADECIMIENTOS**

A lo largo de estos últimos años he contado con el apoyo y ayuda de diversas personas, quienes de alguna u otra manera han contribuido a la realización de la tesis que se presenta, y a quienes desearía dar las gracias en las siguientes líneas.

En primer lugar a mis tutores de tesis, Alberto Torres Cantero, Jaime Mendiola Olivares y José Juan López Espín, porque desde hace más de 3 años me han brindado una ayuda, apoyo y disposición que no ha cesado durante este tiempo. Agradecer no sólo su tiempo, sino todo el aprendizaje, enseñanzas y conocimientos que me han aportado a lo largo de este período.

Agradecer también al apoyo de las distintas entidades que han intervenido en la consecución de este trabajo: Fertilidad Roca, Gestión Clínica Avanzada SLU (Contrato de investigación); Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología, Región de Murcia (08808/PI/08) y Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (PI10/00985).

Mención también al Dr. C. Millán, L. Sarabia, C. Ruiz, E. Belmonte y personal de la clínica Quirón Dexeus de Murcia por su ayuda en la recopilación de datos y a KJ Ruiz-Ruiz y E. Estrella por su labor en la gestión de la base de datos.

Un agradecimiento especial a los distintos compañeros del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Murcia, entre ellos Ana Cutillas, Indra Lazarillo, Miriam Moñino y Lidia Mínguez, por generar un excelente ambiente de trabajo.

También un recuerdo especial a mis compañero/as MIR de Medicina Preventiva y Salud Pública, quienes han sido un apoyo constante a lo largo de estos años, y más que compañero/as se han convertido en verdaderos amigo/as.

Finalmente, de forma destacada, dedicárselo a mi familia, principalmente a mis padres, Tomás y Pilar, así como a mis hermanos, Tomás, Olga y M<sup>a</sup> Salud, que siempre han sido y serán mi mayor apoyo y mi mayor orgullo. Gracias por todo.

Por supuesto también a Antonio, el mejor compañero que podría haber encontrado y quien me ha dado lo que más quiero.

## Tabla de contenidos

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS .....	7
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	11
RELACIÓN DE ARTÍCULOS INCLUIDOS .....	13
1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y JUSTIFICACIÓN .....	17
a) La distancia anogenital como medida de diferenciación sexual.....	17
b) Relación entre la DAG y el ambiente hormonal durante el desarrollo intrauterino. ....	18
b.1) DAG y ambiente hormonal intraútero por exposiciones exógenas en modelo animal.....	19
b.2) DAG y ambiente hormonal intraútero por exposiciones exógenas en humanos.....	22
b.3) DAG y ambiente hormonal intraútero por exposiciones endógenas en humanos. ....	26
c) Distancia anogenital y función reproductiva en la vida adulta. ....	27
c.1) Evidencias en modelos animales.....	27
c.2) Evidencias en humanos .....	28
d) Justificación del estudio.....	29
2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	41
4. CONCLUSIONES FINALES .....	43
5. ARTÍCULOS INCLUIDOS.....	45
ARTÍCULO 1: ANOGENITAL DISTANCE OF WOMEN IN RELATION TO THEIR MOTHER’S GYNAECOLOGICAL CHARACTERISTICS BEFORE OR DURING PREGNANCY .....	47
ARTÍCULO 2: LONGER ANOGENITAL DISTANCE IS ASSOCIATED WITH HIGHER TESTOSTERONE LEVELS IN WOMEN: A CROSS-SECTIONAL STUDY .....	51
ARTÍCULO 3: DISTANCIA ANOGENITAL EN MUJERES Y SU RELACIÓN CON EXPOSICIONES PRENATALES MATERNAS.....	55
6. APÉNDICES/ANEXOS.....	59





## ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

**DAG:** Distancia anogenital

**DAG<sub>AH</sub>:** Distancia anogenital ano-horquilla vulvar

**DAG<sub>AC</sub>:** Distancia anogenital ano-clítoris

**DAG<sub>AS</sub>:** Distancia anogenital ano-escrotal

**DAG<sub>AP</sub>:** Distancia anogenital ano-peneana

**IAG:** Índice anogenital

**SOP:** Síndrome de ovario poliquístico

**T:** Testosterona

**DHT:** Dihidrotestosterona

**LH:** Hormona luteinizante

**AMH:** Hormona antimülleriana

**DE:** Disruptor endocrino

**DDT:** Diclorodifeniltricloroetano

**DDE:** Diclorodifenildicloroetileno

**PCB:** Policlorobifenilos

**BPA:** Bisfenol A

**MEP:** Monoetílico ftalato

**MBP:** Monobutil ftalato

**MBzP:** Monobencil ftalato

**MiBP:** Monoisobutil ftalato

**MEHP:** Mono-(2-etil)-hexil ftalato

**MEOHP:** Mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalato

**MEHHP:** Mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalato

**DINP:** Diisonilftalato

**Oh-MMeOP:** Mono-(4-metil-7-hidroxil octil) ftalato

**Oxo-MMeOP:** Mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalato

**COP:** Contaminante orgánico persistente



## RESUMEN

**Introducción:** La distancia anogenital (DAG) es un marcador de desarrollo genital que presenta dimorfismo sexual en mamíferos. Diversos estudios experimentales han mostrado que la DAG al nacimiento refleja la exposición androgénica a la que el feto ha estado expuesta durante su desarrollo intrauterino y predice la DAG en la vida adulta. A su vez, la DAG se ha mostrado asociada con los niveles séricos de andrógenos y función reproductiva en varones, algo que no ha sido estudiado en población femenina humana.

El objetivo de este estudio fue explorar la relación entre características ginecológicas y exposiciones maternas con parámetros del sistema reproductivo en la descendencia femenina.

**Métodos:** Se trata de un estudio transversal realizado entre febrero-noviembre del 2011 que incluyó 100 jóvenes universitarias sanas entre 18-23 años de la Región de Murcia. A cada participante se le realizó un examen físico y ginecológico completo que incluyó dos variantes de DAG: ano-clítoris ( $DAG_{AC}$ ) y ano-horquilla vulvar ( $DAG_{AH}$ ). Además se tomó una muestra de sangre de las jóvenes participantes y tanto éstas como sus madres completaron un cuestionario epidemiológico sobre estilos de vida e historia ginecológica. Se utilizó un análisis de regresión lineal para examinar la asociación entre las medidas de DAG y características ginecológicas maternas y la relación entre las DAGs y niveles de hormonas reproductivas en las jóvenes. Se empleó análisis de regresión lineal y logística multivariante para conocer las asociaciones entre las exposiciones maternas a productos de uso cotidiano durante el embarazo y la DAG de las hijas, y entre las DAGs y características del sistema reproductivo de las universitarias.

**Resultados:** Se encontró una asociación positiva estadísticamente significativa entre mayor exposición materna a insecticidas/ plaguicidas y disolventes/desengrasantes durante el embarazo y  $DAG_{AH}$  en descendencia femenina (OR: 3.9; IC 95% 1.2, 12.7 y 3.8; IC 95% 1.1, 12.6, respectivamente), así como entre la presencia de ciclos menstruales irregulares maternos antes del embarazo y mayor  $DAG_{AH}$  de sus hijas ( $p=0,03$ ).  $DAG_{AH}$  de las jóvenes participantes se asoció positivamente con sus niveles de testosterona en suero ( $p<0,05$ ). Testosterona sérica aumentó 0,06 ng / ml (IC del 95%: 0.01, 0.10;  $p=0.02$ ) por

cada cm de aumento de  $AGD_{AH}$ . Además, ambas medidas de DAG se asociaron positivamente con el número de folículos ováricos en las universitarias. Aquellas con  $DAG_{AH}$  y  $DAG_{AC}$  en el tercil superior eran más propensas a tener  $\geq 6$  folículos ováricos [OR: 6,0 (IC del 95%: 2,0, 17,6) y 3,0 (IC 95 % 1.1, 8.6), respectivamente] en comparación con aquellas del tercil inferior.

**Conclusiones:** Nuestros resultados respaldan que ciertas condiciones y exposiciones maternas durante el período prenatal podrían estar asociadas con variaciones de las DAGs en sus hijas. Las DAGs son útiles como biomarcador que refleja la exposición androgénica fetal durante el desarrollo intraútero. Además, la DAG parece predecir el desarrollo reproductivo normal en las mujeres, y podría ser una nueva herramienta de potencial interés clínico para evaluar la función ovárica. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el medio ambiente androgénico durante la vida fetal temprana puede influir en el desarrollo del sistema reproductivo de las mujeres.

**Palabras clave:** Distancia anogenital, andrógenos, morfología ovárica, exposición prenatal, tracto reproductivo, ciclos irregulares, mujeres, alteradores endocrinos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Anogenital distance (AGD) is a sexually dimorphic trait in mammals. Several experimental studies have shown that AGD at birth reflects androgen levels during in utero development and predicts AGD in adulthood. In men, a positive association between AGD and androgen levels as well as reproductive function has been shown, which has not been studied in human female population.

The aim of this study was to explore the relationship between the mother's gynaecological characteristics and maternal exposures and some health reproductive characteristics in the female offspring.

**Methods:** This is a cross sectional study of 100 healthy young university students (18–23 years old) carried out between February 2011 and November 2011 in the Murcia region. Physical and gynaecological examinations were conducted on the young women taking two variants of AGD: anus-clitoris ( $AGD_{AC}$ ) and anus-fourchette ( $AGD_{AF}$ ). Besides, all participants provided a blood sample for determination of reproductive hormones and the students as well as their mothers completed an epidemiological questionnaire on lifestyles and gynaecological history. We used multiple linear regression analysis to examine the associations between AGD measurements and the mothers' gynaecological characteristics as well as AGD and the reproductive hormone levels in the young participants. We used multiple linear and logistic regression analysis to examine the association between maternal exposition to products of daily use during pregnancy and the AGD in their female offspring as well as between AGD and features of the students' reproductive system.

**Results:** A statistically significant positive association was found between maternal exposure to insecticides/pesticides and solvents/degreasers during pregnancy and  $AGD_{AF}$  in female offspring (OR: 3.9, 95% CI 1.2, 12.7 and 3.8, 95% CI 1.1, 12.6, respectively) as well as between the presence of maternal irregular menstrual cycles before pregnancy and their daughters'  $AGD_{AF}$  greater ( $p=0.03$ ). The young participants'  $AGD_{AF}$  was positively associated with serum testosterone levels ( $p<0.05$ ). Serum testosterone increased 0.06 ng/ml (95% CI 0.01, 0.10;  $p=0.02$ ) for each cm of increase in  $AGD_{AF}$ .

Besides, both AGD measures were positively associated with ovarian follicle number in the university students. Women in the upper tertile of AGD<sub>AF</sub> and AGD<sub>AC</sub> distributions were more likely to have ≥ 6 ovarian follicles [OR: 6.0 (95% CI 2.0, 17.6) and 3.0 (95% CI 1.1, 8.6), respectively] compared to women in the lowest tertile.

**Conclusion:** Our results suggest that certain maternal characteristics and exposures during in utero development are related to AGD in female offspring. AGD can be used as a sensitive biomarker of exposure to androgens in utero development. AGD might predict normal genital development in women, and might be used as a new instrument to evaluate ovarian function. Our results suggest, therefore, that the androgenic environment during early fetal life may exert a fundamental influence in the human female reproductive system.

**Keywords:** Anogenital distance, androgens, ovarian morphology, prenatal exposure, reproductive tract, irregular cycles, women, endocrine disruptors.

## RELACIÓN DE ARTÍCULOS INCLUIDOS

Esta tesis doctoral ha sido realizada según la modalidad de compendio de trabajos publicados en revistas científicas incluidas en índices de calidad como el *Journal Citation Reports* (JCR) o Latindex.

A continuación se presentan las publicaciones que componen esta tesis así como mi aportación en cada una de ellas:

### Artículo 1:

“Mira-Escolano MP, Mendiola J, Mínguez-Alarcón L, Roca M, Cutillas-Tolín A, López-Espín JJ, Torres-Cantero AM. Anogenital distance of women in relation to their mother's gynaecological characteristics before or during pregnancy. *Reprod Biomed Online*. 2014;28:209-15.

Información previa y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 6 de mayo de 2013; aceptado el 24 de septiembre de 2013.
- Factor de impacto (JCR, 2013): 2,980
- Área temática y posición: Obstetrics & Gynecology; 10/78 (Q1).

Aportación del doctorando: He liderado la elaboración de este manuscrito. Realicé las búsquedas bibliográficas para actualizar la información existente sobre el objetivo del estudio e interpretar los resultados obtenidos. Realicé los análisis estadísticos descriptivos y multivariantes, con el objetivo de estudiar la posible relación entre características ginecológicas maternas durante o previamente al embarazo y la DAG en descendencia femenina. Elaboré las tablas y gráficos relacionados con los resultados principales así como en la redacción de los borradores hasta la versión final del manuscrito.

### Artículo 2:

“Mira-Escolano MP, Mendiola J, Mínguez-Alarcón L, Melgarejo M, Cutillas-Tolín A, Roca M, López-Espín JJ, Noguera-Velasco JA, Torres-Cantero AM. Longer anogenital distance is associated with higher testosterone levels in women: a cross-sectional study. BJOG. 2014;121:1359-64”

Información previa y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 23 de noviembre de 2013; aceptado el 7 de febrero de 2014.
- Factor de impacto (JCR, 2013): 3,862
- Área temática y posición: Obstetrics & Gynecology; 8/78 (Q1).

Aportación del doctorando: He liderado la elaboración de este manuscrito. Realicé las búsquedas bibliográficas para actualizar la información existente sobre el objetivo del estudio e interpretar los resultados obtenidos. Realicé los análisis estadísticos descriptivos y multivariantes, con el objetivo de conocer la posible relación entre la DAG en mujeres adultas y los niveles de hormonas reproductivas en éstas. Elaboré las tablas y gráficos relacionados con los resultados principales así como en la redacción de los borradores hasta la versión final del manuscrito.

### Artículo 3:

“Mira-Escolano MP, Mendiola J, Mínguez-Alarcón L, Roca M, López-Espín JJ, Torres-Cantero AM. Distancia anogenital en mujeres y su relación con exposiciones prenatales maternas. Rev salud ambient. 2014;14:20-8”

Información previa y criterios de calidad:

- Manuscrito recibido el 1 de febrero de 2014; aceptado el 26 de mayo de 2014.
- Características cumplidas (Latindex, 2014): 29/36.
- Área temática: Medicina, salud pública.



Aportación del doctorando: He liderado la elaboración de este manuscrito. Realicé las búsquedas bibliográficas para actualizar la información existente sobre el objetivo del estudio e interpretar los resultados obtenidos. Realicé los análisis estadísticos descriptivos y multivariantes, para estudiar la posible relación entre exposiciones maternas a productos de uso cotidiano durante el embarazo y DAG en descendencia femenina. Por último, también he liderado la realización de las tablas y gráficos relacionados con los resultados principales, así como en la redacción de los borradores hasta la versión final del manuscrito.

Como anexo se adjuntan el artículo “Anogenital distance is related to ovarian follicular number in young Spanish women: a cross-sectional study” publicado con fecha anterior a la aceptación del proyecto de tesis doctoral, y la carta al editor “Anogenital distance in newborns”.



## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y JUSTIFICACIÓN

### *a) La distancia anogenital como medida de diferenciación sexual.*

La distancia anogenital (DAG) ha sido utilizada en estudios sobre mamíferos placentarios como un marcador de desarrollo genital, el cuál presenta dimorfismo sexual, siendo en promedio alrededor de dos veces más largo en machos respecto a hembras.<sup>(1-7)</sup>

Pese a que esta medida ha sido ampliamente estudiada en animales para la diferenciación sexual de los individuos, su estudio en humanos es más reciente y por tanto son escasos los estudios en los que se ofrecen mediciones en éstos.<sup>(5-9)</sup>

En un estudio realizado en 2009, Thankamony y colaboradores evaluaron a 889 niños (463 varones y 426 mujeres) desde el nacimiento hasta los 2 años de vida (3, 12, 18 y 24 meses de edad), con el objetivo de crear curvas de normalidad de DAG y determinar su asociación con otros parámetros antropométricos. Las mediciones realizadas comprendieron las distancias ano-escrotal (DAG<sub>AS</sub>) en varones y ano-horquilla vulvar (DAG<sub>AH</sub>) en el caso de las niñas.<sup>(7)</sup>

La DAG media (desviación estándar) al nacimiento en los varones fue de 19,8 (6,1) mm y 9,1 (2,8) mm en las niñas; ( $p < 0,0001$ ), aumentando hasta los 24 meses de edad en ambos sexos y manteniendo un patrón de dimorfismo sexual a lo largo del período estudiado. Además, en los niños se observó una correlación positiva entre la DAG y la longitud peneana al nacimiento ( $R=0,18$ ,  $p=0,003$ ), así como entre el aumento de la DAG y crecimiento peneano durante los 3 primeros meses de vida ( $R=0,20$ ,  $p=0,001$ ). Estas asociaciones parecen reflejar el efecto de los andrógenos prenatales y el aumento de su secreción en la etapa postnatal temprana, por lo que la DAG parece ser útil como marcador de acción androgénica.

La principal relevancia de este trabajo radicó, tal como señalan sus autores, en constituir un estudio longitudinal con un elevado número de mediciones de DAG, permitiendo establecer curvas de normalidad de esta medida antropométrica. Esto podría ser útil para investigaciones posteriores, en los que se emplee la DAG como marcador

biológico de la exposición prenatal a sustancias químicas ambientales con acción androgénica, con el objetivo de comparar los resultados con estas tablas de normalidad.

En otro estudio más reciente, Agramunt y colaboradores (2011) llevaron a cabo un estudio observacional en el que evaluaron a 153 recién nacidos entre octubre de 2008 y noviembre del 2009 en el Hospital del Mar (Barcelona). En este estudio se realizaron mediciones distinguiendo entre 2 medidas para cada uno de los sexos. Los resultados arrojaron unas cifras medias de 46,3 mm para la distancia comprendida entre el ano-pene ( $DAG_{AP}$ ) en varones y 34,8 mm entre el ano-clítoris en mujeres ( $DAG_{AC}$ ). La  $DAG_{AS}$  en niños y  $DAG_{AH}$  en niñas obtuvieron un valor medio de 24,2 mm y 13,9 mm respectivamente.<sup>(10)</sup> Se concluye que, pese a que los grupos eran comparables en medidas antropométricas generales, existía un claro dimorfismo de la DAG entre los dos sexos.

#### ***b) Relación entre la DAG y el ambiente hormonal durante el desarrollo intrauterino.***

Varios estudios experimentales han mostrado durante años que la DAG al nacimiento, la cual se determina intraútero, proporciona una lectura fiable del nivel de exposición a andrógenos a los que el feto ha estado expuesto durante su desarrollo en el útero materno.<sup>(3,11)</sup>

Básicamente, tal como han señalado estudios en modelo animal, el tracto reproductivo es susceptible a la virilización por exposición a andrógenos endógenos y exógenos antes y durante la ventana de programación de la masculinización en el útero. De esta manera, una exposición prenatal a elevados niveles de andrógenos da como resultado una DAG más larga y masculina en la descendencia al nacimiento.<sup>(12-14)</sup>

Esto se demuestra en el estudio de Wu y colegas (2010), en el que tras administrar inyecciones subcutáneas diarias de testosterona libre (T) o dihidrotestosterona (DHT) en ratas preñadas, se observó en la descendencia femenina una mayor DAG al nacimiento en comparación con aquella procedente del grupo control.<sup>(14)</sup>

Menos se sabe, sin embargo, sobre la DAG en mujeres. No obstante, existen artículos que informan de la virilización del tracto urogenital inferior tras la exposición prenatal a hormonas androgénicas endógenas o exógenas.<sup>(15,16)</sup>

Además, al igual que se demostró previamente en roedores,<sup>(11)</sup> se ha observado que la DAG en humanos varones es similar en hombres de distintas edades, proporcionando una medida fiable del nivel de exposición prenatal a andrógenos ya en la vida adulta,<sup>(17)</sup> algo que hasta el momento de la realización de este trabajo no ha sido estudiado en población humana femenina adulta.

### **b.1) DAG y ambiente hormonal intraútero por exposiciones exógenas en modelo animal.**

Según la hipótesis de disrupción endocrinológica, las anomalías genitales congénitas masculinas como hipospadias o criptorquidia así como el empeoramiento de calidad seminal o el cáncer testicular, parecen estar en relación con la exposición intrauterina a sustancias que actúan como disruptores endocrinos (DE) con efecto antiandrogénico o estrogénico.<sup>(18)</sup>

Se puede definir como DE, también conocidos como moduladores endocrinológicos ambientales o alteradores endocrinos, a toda aquella sustancia química, exógena al organismo humano o animal, que presenta capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino, pudiendo afectar a la función reproductiva de aquellos organismos expuestos, así como su descendencia.<sup>(19)</sup>

Las acciones biológicas de las hormonas sintetizadas dentro de un organismo, tales como los estrógenos, progesterona o testosterona, son mediadas por proteínas receptoras de alta afinidad localizadas en el interior de las células diana. Ésta interacción de la hormona con su receptor inicia una cascada de sucesos que llevan a innumerables efectos asociados con cada hormona en particular. Así, los efectos sobre el equilibrio hormonal que ejercen los DE se explicarían por su capacidad de actuar de diferentes formas: Mimetizando la acción de las hormonas, como antagonistas de la acción de las hormonas, alterando el patrón de síntesis y metabolismo hormonal, modulando los niveles de los receptores correspondientes y/o alterando la actividad enzimática y de proteínas transportadoras.<sup>(20)</sup>

Estas moléculas se encuentran en distintos productos, algunos de ellos de uso cotidiano, tales como plaguicidas, dentro de los cuáles se encuentra el metoxicloro o los ya retirados DDT (diclorodifeniltricloroetano) y PCB (policlorobifenilos).<sup>(10)</sup> También existen derivados fenólicos (fenilfenol, nonoxinol o bisfenol A) que son utilizados como desinfectantes, espermicidas o herbicidas, así como sustancias farmacológicas con efecto disruptor, tales como betabloqueantes, hipolipemiantes, antibióticos o antiepilépticos.<sup>(21)</sup>

Algunos ejemplos de la acción de los DE se presentan en las siguientes tablas:<sup>(22)</sup>

**Table 1. Mechanisms of action of EDs: binding to receptors**

Substances	Mechanisms	Major effect	Biological effects
<b>Agonists</b>			
Bisphenol-A; Phtalates Polyphenols including isoflavones and genistein Some UV-screens (benzophenone 2; cinnamate; camphor devivatives)	Activation via ERE	Estrogenic	Adverse effects on reproduction; uterus, mammary gland
<b>Antagonists</b>			
Pesticides, fungicides, herbicides (linurone, procymidone, vinclocolin) dioxin	Various mechanism often inhibition of ARE mediation	Antiandrogenic	Adverse effects on reproduction

EDs: Endocrine disruptors, ERE: Estrogen Response Elements, ARE: Androgene Response Elements

**Table 2. Mechanisms of action of endocrine disrupting chemicals; effects on enzymes or transport proteins**

Substances	Mechanism	Affected hormone(s)	Biological effect
Fungicides (azoles)	Synthesis inhibitors: Inhibition affected step of synthesis (sterol demethylase and chromatase)	All steroids;	inhibition of adrenal steroids is particularly important; life-threatening reduction of adrenal corticoids
Isoflavones	Inhibition of thyroid peroxidase	Thyroxin synthesis (hypothyroidism)	
Polyphenols (isoflavones, genistein)	Sulfatase increased decreased sulfo-transferase	Free estrogen increased	
<b>Effects on proteins transport</b>			
Isoflavones, polychlorinated diphenols	Transthyretin (the transport protein of thyroid hormones)	Altered amounts of free thyroid hormones	

Son muchos los estudios en modelo animal que han informado sobre la exposición exógena a diversos productos químicos que actúan como DE ambientales durante el período prenatal y su capacidad para modifican el equilibrio hormonal del organismo, afectando al desarrollo del tracto reproductivo.<sup>(23-30)</sup>

La DAG, empleada durante años como marcador final del desarrollo en estudios toxicológicos en animales, es considerado desde hace años como uno de los biomarcadores más sensibles y útiles de las exposiciones a químicos ambientales que actúan como DE medioambientales con efecto androgénico o antiandrogénico durante la etapa intrauterina.<sup>(31-43)</sup>

Como ejemplo, estudios realizados en roedores macho han encontrado una asociación entre efectos reproductivos antiandrogénicos tales como la criptorquidia, hipospadias o disminución de la DAG, con la exposición prenatal a ésteres del ácido ftálico o ftalatos, los cuales se encuentran en plásticos, productos cosméticos y herbicidas, entre otros.<sup>(44-49)</sup>

Otros estudios han observados estos mismos resultados para la exposición a dioxinas<sup>(50,51)</sup> o herbicidas como la atracina.<sup>(52)</sup> Además, la exposición a fungicidas como vinclozolina, antagonista de los receptores a andrógenos, se asocian con alteraciones en el desarrollo del tracto reproductivo de la descendencia masculina, incluyendo acortamiento de la DAG<sup>(53-55)</sup> siendo este efecto dependiente de dosis.<sup>(56)</sup>

En modelos animales hembras se ha mostrado que la exposición a altos niveles de testosterona intraútero induce características masculinas como la anovulación, aumento de la DAG, ausencia de pezones y agenesia de la vagina.<sup>(12,13)</sup>

En ovejas, el exceso de testosterona durante el período prenatal se ha asociado con crías de bajo peso, además de una serie de trastornos reproductivos en la vida adulta, incluyendo el exceso de hormona luteinizante (LH), hiperandrogenismo funcional, defectos neuroendocrinos y presencia de ovario poliquístico, culminando en fracaso reproductivo temprano.<sup>(57,58)</sup>

En roedores hembra los fungicidas triazoles tebuconazol y epoxiconazol han mostrado un efecto virilizante con incremento de la DAG,<sup>(59,60)</sup> mientras que el bisfenol A (BPA), con propiedades estrogénicas y antiandrogénicas, se ha comprobado que es capaz de interrumpir y alterar la función ovárica de la descendencia femenina de roedores hembra,<sup>(24,29,30)</sup> ocasionando alteración de la ovogénesis temprana y formación de folículos ováricos en primates no humanos.<sup>(25)</sup>

En el año 2012, Moyer y Hixon apuntaron que la exposición prenatal a otro conocido DE, el di(2-etilhexil) ftalato, se asociaba con un aumento del número de folículos maduros en ratas adultas en el grupo de mayor exposición con la consiguiente disminución de la vida reproductiva.<sup>(27)</sup>

Por tanto, queda patente por diversos estudios experimentales que la DAG al nacimiento se comporta como una variable capaz de expresar el grado de alteración hormonal prenatal a través de sustancias ambientales que actuarían como disruptores hormonales. Sin embargo, la evidencia en humanos hasta el momento es escasa.<sup>(10)</sup>

## **b.2) DAG y ambiente hormonal intraútero por exposiciones exógenas en humanos.**

La hipótesis de la disrupción endocrinológica surgió a raíz de distintos estudios en los que se informaba de un empeoramiento en la concentración espermática de la población.<sup>(61-63)</sup> En un metaanálisis de 101 estudios publicados entre 1934 y 1996, se hablaba de un descenso medio global en el recuento de espermatozoides (pendiente= -0,94), tanto en estudios realizados en población del Norte de América como Europa, con una disminución estadísticamente significativa en la concentración media de espermatozoides entre 1940 (113 millones/ml) y 1996 (66 millones/ml).<sup>(64)</sup> Además, se observó que la prevalencia de criptorquidia se duplicó desde 1970 hasta los años 90 en Gran Bretaña y en EE. UU.<sup>(65,66)</sup> hecho de especial importancia al encontrarse relacionado con esterilidad y cáncer testicular.<sup>(67,68)</sup> Skakkebaek y colaboradores propusieron en 2001 que los testículos no descendidos, hipospadias, la calidad seminal disminuida y el cáncer testicular forman parte de una única entidad, el síndrome disgenésico testicular, cuyo origen aunque potencialmente multifactorial, parece estar en gran medida asociado a la exposición a DE ambientales.<sup>(69)</sup>

Es sabido que para el correcto desarrollo y funcionamiento de los órganos genitales es preciso un equilibrio entre andrógenos y estrógenos. Un exceso de estos últimos produce una disminución en la actividad esteroideogénica de las enzimas conversores de progesterona en testosterona.<sup>(70)</sup> Asimismo, también se ha demostrado que los estrógenos disminuyen la producción de hormona foliculoestimulante (FSH) en los fetos varones y provocan una disminución en la producción de células de Sertoli con la consiguiente disminución en la concentración espermática.<sup>(71)</sup>



Recientemente, diferentes estudios han mostrado la capacidad de los ésteres de ftalatos (antiandrogénicos) para producir efectos adversos en el desarrollo reproductivo de roedores después de la exposición intrauterina. Estos ésteres y, en particular, el di-butilo, di(2-etilhexil) y butil-bencil ftalatos se han asociado a anomalías tales como malformaciones del epidídimo, conductos deferentes, vesículas seminales, próstata, genitales externos (hipospadias), criptorquidia, además de una feminización que resulta en una DAG reducida.<sup>(45)</sup>

Otros estudios observacionales en seres humanos respaldan estos hallazgos, mostrando una asociación entre la DAG con exposiciones exógenas intraútero, tanto en niños,<sup>(8,9)</sup> como en niñas.<sup>(72)</sup>

En los primeros de ellos, Swan y colegas mostraron una fuerte asociación inversa entre la exposición prenatal a un ambiente con altos niveles de ftalatos (anti-androgénicos) y menor DAG en los bebés humanos varones.<sup>(8,9)</sup>

El grupo de Swan y colaboradores realizó en 2005 el primer estudio que examinó la relación entre la DAG con la exposición prenatal a ftalatos en humanos.<sup>(9)</sup> Para ello se seleccionaron mujeres procedentes de un estudio de cohortes multicéntrico en gestantes. Las participantes completaron un cuestionario y facilitaron una muestra de orina para la determinación de nueve metabolitos de ftalatos. Además, se realizaron mediciones de DAG en 134 recién nacidos entre 2 y 36 meses de edad. Para el análisis estadístico se creó la variable índice anogenital (IAG) que normaliza la DAG por el peso del recién nacido en el examen ( $IAG = DAG / \text{peso (mm/kg)}$ ), y se categorizaron los grados de exposición a ftalatos en cuartiles.

Las concentraciones urinarias de cuatro metabolitos de ftalatos [ftalato monoetilico (MEP), monobutil ftalato (MBP), monobencil ftalato (MBzP), y monoisobutil ftalato (MiBP)] fueron inversamente proporcionales al IAG. Así, aquellos niños cuyas madres presentaron concentraciones mayores de MBP mostraron un menor IAG (odds ratio=10,2). Las odds ratios correspondientes para MEP, MBzP y MiBP fueron de 4,7 , 3,8 y 9,1, respectivamente, siendo los resultados estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Los autores concluyeron que las asociaciones observadas entre la exposición a ftalatos y el IAG eran consistentes con lo observado en estudios previos en modelo animal. Estos datos

apoyarían, por tanto, la hipótesis de que la exposición a mayores niveles ambientales de ftalatos durante el período prenatal puede afectar negativamente en el desarrollo reproductivo masculino.

En otro estudio llevado a cabo en Chiapas (México) entre 2002 y 2003, los autores examinaron la hipótesis de que la exposición intrauterina al insecticida empleado para la prevención de la malaria 1,1,1 -tricloro- 2,2 -bis (p-clorofenil) etano (DDT), así como su metabolito 1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenil) etileno (DDE), ambos con propiedades antiandrogénicas conocidas, asocian una menor DAG. Para ello se obtuvieron mediciones de DAG en 781 recién nacidos varones, y se recogieron muestras sanguíneas maternas. Se analizó la relación entre la DAG media y los valores de DDE, tanto crudos como ajustados por distintos factores de confusión sin hallar diferencias estadísticamente significativas.<sup>(73)</sup>

En el estudio de Huang y colaboradores (2009), se recogieron muestras de líquido amniótico y orina en mujeres embarazadas que tenían planificada la realización de amniocentesis en el hospital universitario de Cheng Kung (Taiwan) durante el período 2005-2006. Se obtuvieron los niveles medios de cinco ftalatos monoésteres, junto a la medición de la DAG de sus hijos al nacimiento (32 niñas y 33 niños). Se observó una correlación negativa significativa entre las concentraciones de MBP en el líquido amniótico de las madres, con la DAG ( $R = -0,31$ ,  $p < 0,06$ ), y el IAG ajustado por peso al nacer ( $R = -0,32$ ,  $p < 0,05$ ) en sus hijas. El estudio concluye que, tal como sugieren sus datos, la exposición prenatal a ftalatos parece tener efectos antiandrogénicos en el feto.<sup>(72)</sup>

En otro estudio llevado a cabo recientemente por Bornehag y cols (2015), se fijó como objetivo examinar la asociación entre la exposición a ftalatos durante la etapa prenatal y la DAG en lactantes suecos. Para ello se midieron las DAGs de 196 niños a los 21 meses de edad y se determinaron los niveles de diferentes metabolitos de ftalatos en orina de las madres durante el primer trimestre de embarazo. Este estudio informó de una asociación entre una menor DAG<sub>AS</sub> con mayor exposiciones a metabolitos DINP (diisononilftalato), oh-MMeOP [mono- (4-metil-7-hidroxil octil) ftalato] y oxo-MMeOP [mono (2-etil-5-oxohexil) ftalato]. Los autores concluyeron que sus hallazgos son de gran importancia al tener constancia por estudios previos de la asociación entre DAG masculina más corta con defectos genitales masculinos al nacimiento y deterioro de la función reproductiva en varones durante la vida adulta.<sup>(74)</sup>

En otro estudio publicado el mismo año y cuya finalidad era conocer la posible asociación entre la DAG al nacimiento y la exposición a ftalatos durante el primer trimestre, se observó que tres metabolitos de ftalatos se relacionaban inversamente y de forma significativa con ambas medidas de DAG en varones.<sup>(75)</sup> Estas asociaciones entre la DAG<sub>AS</sub> fueron de  $\beta = -1.12$  (-2.16, -0.07) para mono-(2-etil)-hexil ftalato (MEHP),  $\beta = -1.43$  (-2.49, -0.38) para mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalato (MEOHP), y  $\beta = -1.28$  (-2.29, -0.27) para mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalato (MEHHP), siendo de magnitud similar para la DAG<sub>AP</sub>. No se encontró asociación entre las DAGs en niños con otros metabolitos de ftalatos, ni entre la DAG en niñas con ninguno de los metabolitos estudiados. Los datos sugieren, por tanto, que incluso a bajos niveles la exposición ambiental a metabolitos de ftalatos, éstos puede afectar negativamente sobre el desarrollo genital masculino, pudiendo interferir en la salud reproductiva en el futuro.

Por último, en un estudio realizado en el año 2013 se planteó investigar el posible efecto como DE de la exposición prenatal a contaminantes orgánicos persistentes (COPs) a partir de la dieta materna.<sup>(76)</sup> Se incluyeron mediciones de la DAG de recién nacidos así como de niños pequeños entre 1 y 2 años de Creta, Grecia y Barcelona junto con un estudio de dieta materna a partir de cuestionarios de frecuencia alimentaria. También se determinaron los niveles plasmáticos de dioxinas y COPs a partir de muestras maternas. Se observó como aquellas madres con una “dieta rica en grasas” que incluía, entre otros, mayor ingesta de carne roja, carne procesada, huevos y productos lácteos, se relacionaba con un aumento de concentraciones séricas de las dioxinas en sangre materna. Además existía una asociación inversa entre una mayor puntuación de “dieta rica en grasas” en las madres y DAG<sub>AS</sub> en los varones recién nacidos. De hecho, el tertil más alto de la puntuación materna de “dieta rica en grasas” se asoció con una reducción de la DAG<sub>AS</sub> de los varones de -4,2 mm (IC 95% -6,6 a -1,8), en comparación con el tertil más bajo. Para la DAG<sub>AH</sub> de las niñas recién nacidas y la “dieta alta en grasas” de sus progenitoras se encontró una asociación positiva débil. En definitiva, se concluye que la dieta alta en grasas por parte de la madre podría estar relacionada con la exposición prenatal de altos niveles de COPs, lo cual podría tener efectos perturbadores endocrinos sobre la descendencia con alteraciones fenotípicas del sistema reproductivo.<sup>(76)</sup>

### **b.3) DAG y ambiente hormonal intraútero por exposiciones endógenas en humanos.**

En un estudio reciente con datos proceden de embarazadas de 4 ciudades de Estados Unidos desde 1999 hasta 2005, se examinó la asociación entre distintas características maternas (edad de la concepción, edad de la menarquía, edad primer parto, paridad y número de embarazos) con las medidas de DAG en sus descendientes.<sup>(77)</sup> Se midió la DAG en 289 niños (140 varones, 149 mujeres) nacidos de las participantes del estudio. En los modelos de regresión lineal, la edad materna se asoció positivamente con la DAG<sub>AP</sub> en lactantes de sexo masculino ( $\beta = 0,50$ ;  $p = 0,002$ ) y DAG<sub>AS</sub> ( $\beta = 0,29$ ;  $p = 0,02$ ). La paridad se asoció inversamente con la DAG<sub>AS</sub> en lactantes varones ( $\beta = -1,68$ ;  $p = 0,03$ ). Se plantea, por tanto, que los cambios fisiológicos asociados con la edad materna y la paridad podría alterar la secreción de esteroides gonadales del feto varón. Así, la producción de andrógenos fetales durante el período crítico para el desarrollo reproductivo (a finales del primer trimestre), puede ser mayor en los niños gestados por madres de mayor edad o primíparas que en aquellos de madres jóvenes o multíparas. No obstante, se concluye que el mecanismo subyacente a las relaciones encontradas es desconocido y debe ser estudiado en futuros trabajos.

Otros estudios han apuntado que las mujeres embarazadas con alteraciones ginecológicas tales como síndrome de ovario poliquístico (SOP) presentan concentraciones circulantes de andrógenos elevadas durante la gestación, pudiendo aumentar la exposición fetal a andrógenos. Por tanto, como resultado del medio hiperandrogénico intrauterino, la descendencia humana femenina parece tener un mayor riesgo de alteración en el desarrollo y función ovárica, así como mayor DAG.<sup>(78,79)</sup>

También los ciclos menstruales irregulares se han asociado con mayores concentraciones de andrógenos en mujeres. De hecho, se ha observado como adolescentes con oligomenorrea o ciclos anovulatorios presentan con más frecuencia hiperandrogenismo en comparación con aquellas que refieren ciclos menstruales regulares.<sup>(80-83)</sup> En mujeres adultas sanas, Van Anders y Watson (2006) informaron de una correlación significativa entre la existencia de menstruaciones irregulares y una mayor concentración de testosterona.<sup>(84)</sup>

A pesar de ello, hasta el momento se desconoce la posible relación entre las características ginecológicas maternas antes o durante el embarazo que puedan suponer un ambiente hiperandrogénico fetal, y la DAG en la descendencia femenina adulta como marcador indirecto de ambiente hormonal durante su desarrollo prenatal.

### *c) Distancia anogenital y función reproductiva en la vida adulta.*

#### **c.1) Evidencias en modelos animales**

Estudios en modelo animal han mostrado que la DAG al nacimiento puede predecir la DAG y función reproductiva durante la vida adulta.

En roedores machos, una DAG acortada (ajustada por peso) persiste en la edad adulta y predice una función reproductiva comprometida en el macho adulto, asociando menor tamaño testicular y existencia de malformaciones reproductivas.<sup>(3,4,11)</sup>

Existen pocos estudios experimentales que exploren la relación entre la DAG y la función reproductiva en hembras. En estos estudios sobre roedores hembras, los resultados mostraron como una mayor DAG al nacimiento se asociaba con ciclos menstruales prolongados e irregulares, mayores niveles de T y LH, así como un mayor reclutamiento folicular con mayor número de folículos preantrales y antrales, anovulación y quistes dilatados respecto a lo observado en aquellas pertenecientes al grupo control.<sup>(14,57,58,85)</sup> Estos datos son consistentes con la hipótesis de que el exceso de andrógenos durante el período prenatal (endógeno o exógeno) se relaciona con mayor DAG al nacimiento, y puede asociarse con la presencia de SOP en la descendencia femenina.<sup>(86,87)</sup>

En un estudio sobre modelo animal realizado en el año 2014, se examinaron los efectos de la exposición prenatal a dosis previamente documentados de testosterona sobre los fetos hembras.<sup>(88)</sup> Se observó que la DAG se incrementaba significativamente en las crías de los grupos experimentales que habían recibido inyecciones subcutáneas de testosterona respecto a los grupos control ( $p < 0,001$ ), incrementándose además los niveles de testosterona ( $p < 0,05$ ) y LH ( $p < 0,01$ ) con reducción significativa del estrógeno ( $p < 0,05$ ) y niveles de hormona antimülleriana (AMH) ( $p < 0,001$ ). También se observó un aumento significativo en el número de folículos preantrales y antrales en los ovarios de las crías del

grupo experimental ( $p < 0,05$ ), por lo que se acaba concluyendo que el tiempo de exposición prenatal a los andrógenos puede tener un papel significativo en el desarrollo de SOP en la descendencia, asociando tanto cambios hormonales como trastornos morfológicos del sistema reproductivo. El estudio acaba advirtiendo que evitar la exposición a un exceso de andrógenos durante el desarrollo fetal podría prevenir o reducir las manifestaciones del SOP en la descendencia durante la edad adulta por exceso de andrógenos prenatales.<sup>(88)</sup>

### **c.2) Evidencias en humanos**

Recientemente, varios estudios en varones adultos han proporcionado una fuerte evidencia sobre la relación entre la longitud de la DAG y la función reproductiva masculina. Se ha observado como una DAG acortada se relaciona con bajo potencial reproductivo, asociando anomalías genitales como hipospadias y criptorquidia, menores niveles séricos de andrógenos y peor calidad seminal con menor recuento espermático.<sup>(46,89-91)</sup>

En 2011, un estudio evaluó la asociación entre la DAG y parámetros seminales en varones adultos.<sup>(91)</sup> Se observó como una mayor DAG se relacionaba con una mayor concentración y motilidad espermática, así como con un mayor recuento total de espermatozoides y espermatozoides móviles ( $p$ -valores entre 0,002-0,048). Este estudio concluyó que la DAG<sub>AS</sub> proporciona una fuerte correlación con los distintos parámetros seminales, siendo un predictor útil de la concentración espermática en la vida adulta.

Por tanto, estos estudios concluyen que el entorno androgénico durante la vida fetal temprana parece ejercer una influencia tanto sobre la DAG como sobre los parámetros espermáticos y hormonales en hombres adultos.

Por el contrario, la información de la que se dispone sobre la DAG en mujeres y su posible relación con la función reproductiva en la vida adulta es escasa. Hasta el momento de la realización de este trabajo, únicamente unos pocos estudios en modelos animales habían estudiado este aspecto,<sup>(14)</sup> no existiendo ningún estudio en población humana femenina adulta. No obstante, existen estudios posteriores en los que se han realizado mediciones de DAG en mujeres adultas, demostrando la estabilidad de esta medida antropométrica durante el ciclo menstrual.<sup>(92)</sup>

#### *d) Justificación del estudio*

Como se ha expuesto anteriormente, los estudios realizados sobre modelo animal han apuntado que una alteración de la DAG puede ser un indicador útil de exposición androgénica o antiandrogénica intraútero.<sup>(3,12-14,93)</sup> Además, en los estudios llevados a cabo en hombres parece que esta medida antropométrica guarda un vínculo con la función reproductiva en el adulto, por lo que podría proporcionar un vínculo fiable entre el ambiente hormonal prenatal y la capacidad reproductiva durante la vida adulta.<sup>(89-91)</sup>

Sin embargo, y en base a la bibliografía consultada, aunque existen varios estudios que han realizado dichas mediciones en bebés chicas,<sup>(5-8)</sup> son pocos los que han aportado datos sobre la DAG en mujeres adultas. De hecho, ninguno de ellos ha evaluado hasta la realización de este trabajo, la posible asociación de la DAG con distintas características y/o exposiciones maternas, así como tampoco con características ginecológicas que puedan estar asociadas con trastornos reproductivos durante la vida adulta, siendo objeto del presente trabajo.





## 2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Greenham LW, Greenham V. Sexing mouse pups. *Lab Anim.* 1977;11(3):181–184.
2. Kurzrock EA, Jegatheesan P, Cunha GR, Baskin LS. Urethral development in the fetal rabbit and induction of hypospadias: a model for human development. *J Urol.* 2000;164(5):1786–1792.
3. Macleod DJ, Sharpe RM, Welsh M, Fisker M, Scott HM, Hutchison GR, et al. Androgenaction in the masculinization programming window and development of male reproductive organs. *Int J Androl.* 2010;33(2):279–287.
4. Scott HM, Hutchison GR, Jobling MS, McKinnell C, Drake AJ, Sharpe RM. Relationship between androgen action in the ‘male programming window’, fetal Sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinol.* 2008;149(10):5280–5287.
5. Salazar-Martinez E, Romano-Riquer P, Yanez-Marquez E, Longnecker MP, Hernandez-Avila M. Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study. *Environ Health.* 2004;3(1):8.
6. Sathyanarayana S, Beard L, Zhou C, Grady R. Measurement and correlates of ano-genital distance in healthy newborn infants. *Int J Androl.* 2010;33(2):317–323.
7. Thankamony A, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL, Hughes IA. Anogenital distance from birth to 2 years: a population study. *Environ Health Perspect.* 2009;117(11):1786-1790.
8. Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res.* 2008;108(2):177–184.
9. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. Study for Future Families Research Team. Study for future families research team: decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect.* 2005;113(8):1056–1061.
10. Agramunt S, Kogevinas M, Carreras R. Anogenital distance in newborns: A sensitive marker of prenatal hormonal disruption. *Med Clin (Barc).* 2011;137(10):459- 463.
11. Hotchkiss AK, Parks-Saldutti LG, Ostby JS, Lambright C, Furr J, Vandenberg JG, et al. A mixture of the "anti-androgens" linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. *Biol Reprod.* 2004;71(6):1852–1861.

12. Dean A, Smith LB, Macpherson S, Sharpe RM. The effect of dihydrotestosterone exposure during or prior to the masculinization programming window on reproductive development in male and female rats. *Int J Androl*. 2012;35(3):330–339.
13. Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray LE Jr. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose–response study. *Toxicol Sci*. 2002;65(1):71–86.
14. Wu XY, Li ZL, Wu CY, Liu YM, Lin H, Wang SH, et al. Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague–Dawley rats. *Endocr J*. 2010;57(3):201–209.
15. Callegari C, Everett S, Ross M, Brasel JA. Anogenital ratio: measure of fetal virilization in premature and full-term newborn infants. *J Pediatr*. 1987;111(2): 240–243.
16. Goldman AS, Bongiovanni AM. Induced genital anomalies. *Ann N Y Acad Sci*. 1967;142(3): 755–767.
17. Eisenberg ML, Hsieh TC, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and age. *Andrology*. 2013;1(1):90–93.
18. Vidaeff AC, Sever LE. In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: A systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reprod Toxicol*. 2005;20(1):5–20.
19. Colborn T, Clement C. Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. *Advances in Modern Environmental Toxicology*. Princeton: Princeton Scientific Publishing; 1992. p. 1–8.
20. Rivas A, Granada A, Jiménez M, Olea F, Olea N. Exposición humana a disruptores endocrinos. *Ecosistemas*. 2004;13(3):7-13.
21. Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change. *Environ Health Perspect*. 1999;107(6):907–938.
22. Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones*. 2010;9(1): 9-15.
23. Guillette LJ Jr, Moore BC. Environmental contaminants, fertility, and multiocytic follicles: a lesson from wildlife? *Semin Reprod Med*. 2006;24(3):134–141.
24. Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, et al. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol*. 2003;13(7):546-53.

25. Hunt PA, Lawson C, Gieske M, Murdoch B, Smith H, Marre A, et al. Bisphenol A alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of the rhesus monkey. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(43):17525-30.
26. Karavan JR, Pepling ME. Effects of estrogenic compounds on neonatal oocyte development. *Reprod Toxicol*. 2012;34(1):51–56.
27. Moyer B, Hixon ML. Reproductive effects in F1 adult females exposed in utero to moderate to high doses of mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP). *Reprod Toxicol*. 2012;34(1):43-50.
28. Rivera OE, Varayoud J, Rodríguez HA, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reprod Toxicol*. 2011;32(3):304-12.
29. Rodríguez HA, Santambrosio N, Santamaría CG, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol*. 2010;30(4):550-7.
30. Zhang HQ, Zhang XF, Zhang LJ, Chao HH, Pan B, Feng YM, et al. Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes. *Mol Biol Rep*. 2012;39(5):5651-7.
31. Ema M, Fujii S, Furukawa M, Kiguchi M, Ikka T, Harazono A. Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod Toxicol*. 2001;15(5):505-23.
32. Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, et al. Adverse effects of environmental anti-androgens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl*. 2006;29(1):96–104.
33. Gray LE Jr, Ostby JS, Kelce WR. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994;129(1):46-52.
34. Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, et al. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update*. 2001;7(3):248-64.
35. Gupta C, Shapiro BH, Yaffe SJ. Reproductive dysfunction in male rats following prenatal exposure to phenobarbital. *Pediatr Pharmacol*. 1980;1(1):55-62.
36. Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol*. 2002;16(2):117-22.

37. Mably TA, Moore RW, Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Effects on androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992;114(1):97-107.
38. McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM. Androgen-mediated development in male rat offspring exposed to flutamide in utero: Permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol Sci.* 2001;62(2):230–49.
39. Mylchreest E, Cattley RC, Foster PM. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di (n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol Sci.* 1998;43(1):47-60.
40. Ostby J, Kelce WR, Lambright C, Wolf CJ, Mann P, Gray LE Jr. The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicol Ind Health.* 1999;15(1-2):80-93.
41. Wolf C Jr, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J, et al. Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health.* 1999;15(1-2):94-118.
42. Wolf CJ, LeBlanc GA, Ostby JS, Gray LE Jr. Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. *Toxicol Sci.* 2000;55(1):152-61.
43. Wolf CJ, LeBlanc GA, Gray LE Jr. Interactive effects of vinclozolin and testosterone propionate on pregnancy and sexual differentiation of the male and female SD rat. *Toxicol Sci.* 2004;78(1):135–143.
44. Ema M, Miyawaki E, Hirose A, Kamata E. Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol.* 2003;17(4):407–12.
45. Foster PM. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl.* 2006;29(1):140–147.
46. Hsieh MH, Breyer BN, Eisenberg ML, Baskin LS. Associations among hypospadias, cryptorchidism, anogenital distance and endocrine disruption. *Curr Urol Rep.* 2008; 9(2):137-142.

47. Parks LG, Otsby JS, Lambright CR, Abbot BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci.* 2000;58(2):339–49.
48. Saillenfait AM, Sabaté JP, Gallissot F. Effects of in utero exposure to di-n-hexyl phthalate on the reproductive development of the male rat. *Reprod Toxicol.* 2009;28(4):468–76.
49. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Fail PA, Seely JC, Brine DR, et al. Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol.* 2004;18(2):241–64.
50. Jin MH, Hong CH, Lee HY, Kang HJ, Han SW. Toxic effects of lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on development of male reproductive system: Involvement of antioxidants, oxidants, and p53 protein. *Environ Toxicol.* 2010;25(1):1-8.
51. Jin MH, Ko HK, Hong CH, Han SW. In utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the development of reproductive system in mouse. *Yonsei Med J.* 2008;49(5):843–50.
52. Rosenberg BG, Chen H, Folmer J, Liu J, Papadopoulos V, Zirkin BR. Gestational exposure to atrazine: Effects on the postnatal development of male offspring. *J Androl.* 2008;29(3):304–11.
53. Matsuura I, Saitoh T, Ashina M, Wako Y, Iwata H, Toyota N, et al. Evaluation of a two-generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using vinclozolin. *J Toxicol Sci.* 2005;30:163-88.
54. Schneider S, Kaufmann W, Strauss V, Van Ravenzwaay B. Vinclozolin: a feasibility and sensitivity study of the ILSI-HESI F1-extended one-generation rat reproduction protocol. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011;59(1):91-100.
55. Taxvig C, Vinggaard AM, Hass U, Axelstad M, Metzdorff S, Nellemann C. Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *Int J Androl.* 2008;31(2):170–7.
56. Hass U, Scholze M, Christiansen S, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, et al. Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual differentiation in the rat. *Environ Health Perspect.* 2007;115(1):122–8.
57. Smith P, Steckler TL, Veiga-Lopez A, Padmanabhan V. Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone and dihydrotestosterone on follicular

- recruitment, depletion of follicular reserve, and ovarian morphology in sheep. *Biol Reprod.* 2009;80(4):726–736.
58. Steckler T, Wang J, Bartol FF, Roy SK, Padmanabhan V. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinol.* 2005;146(7):3185–3193.
  59. Taxvig C, Hass U, Axelstad M, Dalgaard M, Boberg J, Andeasen HR, et al. Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol Sci.* 2007;100(2):464-73.
  60. Rockett JC1, Narotsky MG, Thompson KE, Thillainadarajah I, Blystone CR, Goetz AK, et al. Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat. *Reprod Toxicol.* 2006;22(4):647-58.
  61. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect.* 1997;105(11):1228–32.
  62. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 1995;332(5):281–5.
  63. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. *Br Med J.* 1992;305(6854):609–13.
  64. Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published. *Environ Health Perspect.* 2000;108(10):961– 6.
  65. Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, Georget V, Paris F, Jeandel C, et al. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cel Endocrinol.* 2001;178(1-2):99–105.
  66. Paulozzi LJ. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environ Health Prespect.* 1999;107(4):297–302.
  67. Canlorbe P, Toubanc JE, Roger M, Job JC. Endocrine function of the testis in 125 cases of cryptorchism. *Ann Med Interne.* 1974;125(4):365–9.
  68. Morrison AS. Cryptorchidism, hernia and cancer of the testis. *J Natl Cancer Inst.* 1976;56(4):731–3.
  69. Skakkebak NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.* 2001;16(5):972–978.
  70. Bartke A, Williams KIH, Dalterio S. Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro. *Biol Reprod.* 1977;17(5):645–9.

71. Sharpe RM, Skakkeback NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*. 1993;341(8857):1392–5.
72. Huang PC, Kuo PL, Chou YY, Lin SJ, Lee CC. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int*. 2009;35(1):14–20.
73. Longnecker MP, Gladen BC, Cupul-Uicab LA, Romano-Riquer SP, Weber JP, Chapin RE, et al. In utero exposure to the antiandrogen 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethylene (DDE) in relation to anogenital distance in male newborns from Chiapas, Mexico. *Am J Epidemiol*. 2007;165(9):1015–22.
74. Bornehag CG, Carlstedt F, Jönsson BA, Lindh CH, Jensen TK, Bodin A, et al. Prenatal phthalate exposures and anogenital distance in Swedish boys. *Environ Health Perspect*. 2015;123(1):101–7.
75. Swan SH, Sathyanarayana S, Barrett ES, Janssen S, Liu F, Nguyen RH, et al. TIDES Study Team. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Hum Reprod*. 2015;30(4):963–72.
76. Papadopoulou E, Vafeiadi M, Agramunt S, Mathianaki K, Karakosta P, Spanaki A, et al. Maternal diet, prenatal exposure to dioxins and other persistent organic pollutants and anogenital distance in children. *Sci Total Environ*. 2013;461–462:222–29.
77. Barrett ES, Parlett LE, Redmon JB, Swan SH. Evidence for sexually dimorphic associations between maternal characteristics and anogenital distance, a marker of reproductive development. *Am J Epidemiol*. 2014;179(1):57–66.
78. Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Perez-Bravo F, Recabarren SE. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod*. 2002;17(10):2573–2579.
79. Sir-Petermann T, Codner E, Maliqueo M, Echiburú B, Hitschfeld C, Crisosto N, et al. Increased anti-mullerian hormone serum concentrations in prepubertal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):3105–3109.
80. Siegborg R, Nilsson CG, Stenman UH, Widholm O. Endocrinologic features of oligomenorrheic adolescent girl. *Fertil Steril*. 1986;46(5):852–857.
81. Venturoli S, Porcu E, Fabbri R, Magrini O, Paradisi R, Pallotti G, et al. Postmenarchal evolution of endocrine pattern and ovarian aspects in adolescents with menstrual irregularities. *Fertil Steril*. 1987;48(1):78–85.

82. Venturoli S, Porcu E, Fabbri R, Pluchinotta V, Ruggeri S, Macrelli S, et al. Longitudinal change of sonographic ovarian aspects and endocrine parameters in irregular cycles of adolescence. *Pediatr Res.* 1995;38(6):974-980.
83. Venturoli S, Porcu E, Fabbri R, Pluchinotta V, Ruggeri S, Macrelli S, et al. Ovarian multifollicularity, high LH and androgen plasma levels, and anovulation are frequent and strongly linked in adolescent irregular cycles. *Acta Endocrinol.* 1986;111(3):368-372.
84. Van Anders S, Watson N. Menstrual Cycle Irregularities Are Associated With Testosterone Levels in Healthy Premenopausal Women. *Am J of Hum Biol.* 2006;18(6):841–844.
85. Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update.* 2005;11(4):357–374.
86. Forsdike RA, Hardy K, Bull L, Stark J, Webber LJ, Stubbs S, et al. Disordered follicle development in ovaries of prenatally androgenized ewes. *J Endocrinol.* 2007;192(2):421–428.
87. Sloboda DM, Hickey M, Hart R. Reproduction in females: the role of the early life environment. *Hum Reprod Update.* 2011;17(2):210–227.
88. Ramezani Tehrani F, Noroozadeh M, Zahediasl S, Piryaee A, Hashemi S, Azizi F. The time of prenatal androgen exposure affects development of polycystic ovary syndrome-like phenotype in adulthood in female rats. *Int J Endocrinol Metab.* 2014;12(2): e16502.
89. Eisenberg ML, Hsieh MH, Walters RC, Krasnow R, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men. *PLoS One.* 2011; 6(5):e18973.
90. Eisenberg ML, Jensen TK, Walters RC, Skakkebaek NE, Lipshultz LI. The relationship between anogenital distance and reproductive hormone levels in adult men. *J Urol.* 2012; 187(2):594-598.
91. Mendiola J, Stahlhut RW, Jørgensen N, Liu F, Swan SH. Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in Rochester, New York. *Environ Health Perspect.* 2011;119(7):958-63.
92. Barrett ES, Parlett LE, Swan SH. Stability of proposed biomarkers of prenatal androgen exposure over the menstrual cycle. *J Dev Orig Health Dis.* 2015;6(2):149-57.



93. Van den Driesche S, Scott HM, MacLeod DJ, Fiskén M, Walker M, Sharpe RM. Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. *Int J Androl* 2011; 34(6):578-586.



### **3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

#### **Objetivos Generales**

Analizar la relación entre el ambiente hormonal durante el desarrollo intrauterino y la DAG, así como entre esta medida antropométrica y la función reproductiva en mujeres jóvenes.

#### **Objetivos Específicos**

1. Estudiar la relación entre exposiciones prenatales (maternas) a productos o sustancias de uso cotidiano durante el embarazo y la DAG de la descendencia femenina.
2. Analizar la relación entre la DAG en mujeres jóvenes y condiciones maternas que pueden suponer un hiperandrogenismo en la etapa periconcepcional.
3. Conocer la relación entre las medidas de la DAG y niveles séricos de hormonas reproductivas en mujeres jóvenes.
4. Analizar la relación entre las medidas de DAG y características del aparato reproductivo en mujeres adultas.

#### **Hipótesis**

1. Exposiciones prenatales (maternas) a productos o sustancias de uso cotidiano durante el embarazo que contengan sustancias con potencial de alteración endocrina se asocia a una DAG alterada de la descendencia femenina.
2. Condiciones maternas que supongan un ambiente hiperandrogénico fetal se asocian a una DAG más larga en la descendencia femenina adulta.

3. Existe relación entre las medidas de la DAG y niveles séricos de hormonas reproductivas en mujeres jóvenes.
4. Una DAG más larga se asocia a características del aparato reproductivo en mujeres adultas compatibles con ovario multifolicular.

#### 4. CONCLUSIONES FINALES

- Este es el primer trabajo en informar de una asociación entre distintas características ginecológicas y exposiciones maternas a distintos productos y sustancias durante el embarazo con la DAG en la descendencia femenina adulta como marcador indirecto del ambiente hormonal intrauterino.
- Se observa una relación entre la DAG en mujeres jóvenes adultas y exposiciones maternas a distintos productos de uso cotidiano durante el embarazo. Según los resultados obtenidos, aquellas mujeres cuyas madres habían estado más expuestas durante el embarazo a insecticidas/plaguicidas y disolventes/desengrasantes presentaban una DAG<sub>AH</sub> mayor. Por tanto, ciertas exposiciones ambientales maternas durante el período prenatal podrían estar asociadas con variaciones significativas de la DAG en la descendencia femenina, biomarcador que refleja la exposición fetal a andrógenos durante el desarrollo intraútero.
- Se detecta una relación entre las DAGs en mujeres adultas y características ginecológicas de la madre antes o durante el embarazo, observando que una mayor DAG<sub>AH</sub> se asocia significativamente con la presencia de ciclos menstruales irregulares de las madres antes del embarazo. Así, condiciones maternas tales como ciclos menstruales irregulares que pueden suponer un ambiente hiperandrogénico fetal, se relacionan con una DAG más larga en la descendencia femenina adulta.
- Existe asociación entre la DAG en mujeres adultas y sus niveles séricos de hormonas reproductivas. En este caso, la DAG<sub>AH</sub> se asoció positivamente con altos niveles de T en las mujeres adultas. Estos resultados sugieren que los niveles séricos de T en las mujeres adultas puede depender de factores que operan en el período prenatal. Por tanto, una DAG más larga y mayor nivel de andrógenos circulantes en mujeres adultas podrían ser producto de un entorno hiperandrogénico en el útero, lo que sugiere un origen prenatal para la disfunción ovárica.
- Existe relación entre la DAG y características del sistema reproductivo en mujeres adultas. Ambas DAGs se asociaron positiva y fuertemente con la presencia de

mayor número de folículos ováricos. Las mujeres con  $DAG_{AC}$  o  $DAG_{AH}$  en el tercil más alto de la distribución fueron más propensas a tener  $\geq 6$  folículos ováricos respecto de aquellas con una DAG en el tercil inferior. Estos resultados apuntan a que el medio ambiente androgénico durante la vida fetal temprana podría ejercer una influencia tanto en la DAG como sobre las características del sistema reproductivo en mujeres adultas.

- Al asociarse la DAG con el desarrollo genital/reproductivo en las mujeres durante la etapa adulta, esta medida antropométrica podría ser una nueva herramienta de potencial interés clínico para evaluar la función ovárica.

## **5. ARTÍCULOS INCLUIDOS**





***ARTÍCULO 1: ANOGENITAL DISTANCE OF WOMEN IN RELATION TO THEIR MOTHER'S GYNAECOLOGICAL CHARACTERISTICS BEFORE OR DURING PREGNANCY***



**Abstract:** Animal models suggest that anogenital distance (AGD) at birth reflects androgen concentrations during in-utero development and predicts adult AGD. Several human observational studies show an association between menstrual cycle irregularities and a hyperandrogenic environment and that may result in a potential alteration of the female reproductive tract during in-utero development. This study examined associations between AGD of young women and their mother's gynaecological characteristics before or during pregnancy. This is cross-sectional study of 100 college-age volunteers in southern Spain. Physical and gynaecological examinations were conducted on the young women and they and their mothers completed epidemiological questionnaires on lifestyles and gynaecological history. Linear regression analysis was used to examine the association between AGD measurements (anus–fourchette (AGD<sub>AF</sub>) and anus–clitoris (AGD<sub>AC</sub>)) of women and their mother's gynaecological characteristics. Longer AGD<sub>AF</sub> was associated with the presence of mother's menstrual cycle irregularities before pregnancy ( $P = 0.03$ ). Longer female AGD has been related to excess androgen exposure in utero in toxicological studies. The current findings may be consistent with studies in which an association between menstrual cycle irregularities and an hyperandrogenic environment has been reported, which therefore may result in a potential modification of the female offspring's reproductive tract during in-utero development, including AGD.

**Keywords:** androgens, anogenital distance, irregular cycles, prenatal exposure, reproductive tract, women

**Dirección URL:** <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.09.026>



***ARTÍCULO 2: LONGER ANOGENITAL DISTANCE IS ASSOCIATED WITH HIGHER TESTOSTERONE LEVELS IN WOMEN: A CROSS-SECTIONAL STUDY***



**Revista de publicación:** BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynecology.

**Abstract:**

**Objective:** Animal models have suggested that anogenital distance (AGD) at birth reflects androgen levels during in utero development and predicts adult AGD. A recent study showed an association between perineal length and androgen levels in men, suggesting that serum testosterone levels in adulthood will depend on factors involved during the fetal period. The aim of this study is to assess the relationship between AGD measures and reproductive hormone levels in women.

**Design** Cross-sectional study conducted between February and November 2011.

**Setting:** University-affiliated fertility clinics.

**Population:** 100 young college students.

**Methods:** Physical and gynaecological examinations were conducted on university students. All participants provided a blood sample for determination of reproductive hormones and completed an epidemiological questionnaire on lifestyles and gynaecological history. We used multiple linear regression analysis to examine the associations between perineal length measurements [anus-fourchette ( $AGD_{AF}$ ) and anus-clitoris ( $AGD_{AC}$ )] and reproductive hormone levels.

**Main outcome measures:** Anogenital distance measurements and reproductive hormone levels.

**Results:** In the multiple linear regression analyses,  $AGD_{AF}$  was positively associated with serum testosterone levels. Serum testosterone increased 0.06 ng/ml (95%CI 0.01, 0.10;  $P=0.02$ ) for each 1-cm increase in  $AGD_{AF}$ . None of the measurements was associated with other reproductive hormones.

**Conclusions:** Anogenital distance may predict normal reproductive development in women, and may be a new tool of potential clinical interest to evaluate ovarian function. Our results suggest that serum testosterone levels in adulthood may depend on factors operating in the prenatal period.

**Keywords:** Androgens, anogenital distance, prenatal exposure, women.

**Dirección**

**URL:**

[http://www.bjog.org/details/issue/6758141/Volume\\_121\\_Issue\\_11\\_October\\_2014.html](http://www.bjog.org/details/issue/6758141/Volume_121_Issue_11_October_2014.html)



***ARTÍCULO 3: DISTANCIA ANOGENITAL EN MUJERES Y SU RELACIÓN CON EXPOSICIONES PRENATALES MATERNAS***



**Revista de publicación:** Salud Ambiental

**Resumen:** La distancia anogenital (DAG) es un marcador de desarrollo genital que presenta un dimorfismo sexual en mamíferos. Diversos estudios experimentales han mostrado que la DAG al nacimiento refleja la exposición androgénica a la que el feto ha estado expuesto durante su desarrollo intraútero. El objetivo de nuestro estudio fue explorar la relación entre exposiciones prenatales (maternas) a distintos productos o sustancias de uso cotidiano durante el embarazo y la DAG de sus hijas como marcador indirecto del ambiente hormonal intrauterino. Se trata de un estudio transversal que incluyó 100 jóvenes universitarias sanas entre 18 y 23 años. A cada participante se le realizó un examen ginecológico completo y se midieron dos variantes de DAG: ano-clítoris ( $DAG_{AC}$ ) y ano-horquilla vulvar ( $DAG_{AH}$ ). Tanto las jóvenes como sus madres completaron un cuestionario epidemiológico sobre estilos de vida, incluyendo exposición a productos prenatales e historia ginecológica. Las asociaciones entre la exposición a productos prenatales y las DAG de las hijas se realizaron mediante análisis de regresión lineal y logística múltiple. Una mayor exposición materna a insecticidas/plaguicidas y disolventes/desengrasantes se asoció significativamente con una  $DAG_{AH}$  alargada en las hijas (ORa: 3,9; IC 95 % 1,2,- 12,7 y 3,8; IC 95 % 1,1 - 12,6, respectivamente). Nuestros resultados respaldan que ciertas exposiciones prenatales maternas ambientales podrían estar asociadas con variaciones significativas de las DAG en sus hijas, un biomarcador que refleja la exposición androgénica fetal durante el desarrollo intraútero.

**Palabras clave:** alteradores endocrinos; distancia anogenital; exposiciones prenatales; tracto reproductivo; mujeres.

**Dirección URL:** <http://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/588>



## **6. APÉNDICES/ANEXOS**



# **Anogenital distance is related to ovarian follicular number in young Spanish women: a cross-sectional study.**

Jaime Mendiola<sup>1,2\*</sup>, Manuela Roca<sup>1,2</sup>, Lidia Mínguez-Alarcón<sup>1</sup>, Maria-Pilar Mira-Escolano<sup>1</sup>, José J. López-Espín<sup>3</sup>, Emily S. Barrett<sup>4</sup>, Shanna H. Swan<sup>5</sup>, Alberto M. Torres-Cantero<sup>1,6</sup>.

<sup>1</sup>Division of Preventive Medicine and Public Health, Department of Health and Social Sciences, University of Murcia School of Medicine, Espinardo (Murcia) Spain.

<sup>2</sup>Fertilidad Roca, Gestión Clínica Avanzada SLU, Murcia, Spain.

<sup>3</sup>Center of Operations Research, Miguel Hernandez University, Elche, Spain.

<sup>4</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, Rochester, New York, USA.

<sup>5</sup>Department of Preventive Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, USA.

<sup>6</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain.

\*Corresponding author

## **Abstract**

### Background

In animals, anogenital distance (AGD) at birth reflects androgen levels during pregnancy and predicts adult AGD. Little is known about AGD in relation to female reproductive characteristics in humans, a question this study was designed to explore.

### Methods

We used multiple linear and logistic regression analyses to model the relationships between adult female reproductive system characteristics (e.g. ovarian morphology, menstrual cycle) and two measures of AGD [anus-fourchette (AGD<sub>AF</sub>) and anus-clitoris (AGD<sub>AC</sub>)] in 100 college-age volunteers in Spain. Ovarian morphology was classified as having < 6 or ≥ 6 follicles per ovary.

### Results

Both AGD measures were positively associated with ovarian follicle number, with AGD<sub>AF</sub> being more strongly associated. Women in the upper tertile of the AGD<sub>AF</sub> and AGD<sub>AC</sub> distributions were more likely to have ≥ 6 ovarian follicles [OR: 6.0 (95% CI 2.0, 17.6) and 3.0 (95% CI 1.1, 8.6), respectively] compared to women in the lowest tertile.

### Conclusions

Increased follicular recruitment has been related to excess androgen exposure in utero in toxicological studies. Our results suggest that the androgenic environment during early fetal life may influence reproductive system development, including AGD, in human females.

### **Key words**

Androgens, anogenital distance, increased follicular recruitment, ovarian morphology



## **Background**

Anogenital distance (AGD) is routinely used as a developmental endpoint in animal toxicology studies by the U.S. Environmental Protection Agency and is one of the most sensitive markers of in utero exposures to environmental endocrine-disrupting chemicals (EDC) [1,2]. A number of animal studies have shown that exogenous androgen or estrogen exposure (including EDC) during the prenatal period can alter the development of the female reproductive tract [3-15]. For example, bisphenol A (BPA), which may have both estrogenic and anti-androgenic properties, has been shown to disrupt and alter ovarian function [10-14]; and it has recently been demonstrated that BPA alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of nonhuman primates [14]. Moyer and Hixon [15] have recently shown that prenatal exposure to another well-known EDC, di(2-ethylhexyl) phthalate, increased the numbers of mature follicles in adult females in the highest exposure group and the subsequent decrease in overall reproductive lifespan. In rodents, AGD reflects the amount of androgen to which a female fetus is exposed in early development. Indeed, prenatal exposure of females to exogenous androgens results in longer and more masculine AGD [5-7] and increased ovarian follicular recruitment in adulthood compared to controls [3,4,7]. In male rodents, shortened (weight-adjusted) AGD persists into adulthood [16] and predicts compromised reproductive function in the mature male [17,18]. Therefore, in rodents AGD appears to provide a life-long read-out of prenatal androgen action [17].

Swan and colleagues showed a strong inverse association between prenatal environmental exposure to the anti-androgenic phthalates and shorter male AGD in human infants [19,20]. Recently, several studies on adult men have provided strong evidence of the relationship between AGD length and male reproductive function

[21,22]. Thus, AGD may provide a reliable link between prenatal hormonal milieu and adult reproductive function in human males as well. Less is known about AGD in human females, but there are several published reports of virilization of the lower urogenital tract after either prenatal exogenous or endogenous exposure to androgenic hormones [23,24]. Although a number of studies have measured female AGD measurements in human infants [19,20,23,25-27], to our knowledge, no study has measured AGD in adult women. The aim of this study is to investigate the relationship between AGD measures and adult female reproductive system characteristics.

## **Methods**

### Study population

The Murcia Young Women's Study (MYWS) is a cross-sectional study of healthy young university students (18-23 years old) in the Murcia region of Spain. MYWS was carried out between 9<sup>th</sup> February 2011 and 25<sup>th</sup> November 2011. Written informed consent was obtained from all subjects. The Research Ethics Committee of the University of Murcia approved this study.

Flyers stating, "Young healthy female university students wanted for research project" were posted at university campuses to invite students to participate in this study. To be included in MYWS, subjects had to be university students, have been born in Spain after 31<sup>st</sup> December 1987, and be able to contact their mother and ask her to complete a questionnaire. One hundred and twenty-four students contacted us, 15 subjects did not meet inclusion criteria (3 had not been born in Spain and 12 were born before 31<sup>st</sup> December, 1987), leaving 109 (88%) eligible students of whom 100 (92%) agreed to participate in the study. At a scheduled clinic visit subjects underwent a gynecological

examination, including transvaginal ultrasound, and completed an epidemiological questionnaire on lifestyle. Participants were compensated for their participation (€40 gift card).

#### Physical examination and gynecological history

Body weight and height were measured using a digital scale (Tanita SC 330-S, London, UK). Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by squared height in meters. Ovarian and uterine morphology were studied by transvaginal ultrasound using a single ultrasound machine for all imaging studies (Voluson E8<sup>®</sup>; General Electric Healthcare, USA). Women were scanned in the early follicular phase (cycle days 1-5) by two gynecologists (75% by M.R. and 25% by C.M.) using the same classification.

Uterine morphology was assessed as normal or abnormal. Ovaries were classified as having  $< 6$  or  $\geq 6$  follicles per ovary [28,29,30], a cutoff which several studies suggest may have clinical relevance [28,29]. All follicles fell in the 2-10 mm diameter range. Having 6 or more follicles has been associated with hyperprolactinaemia, hypothalamic anovulation or weight-related amenorrhoea and may result from incomplete pulsatile gonadotrophin (GnRH) stimulation of ovarian follicular development (28). It may also indicate an ovarian dysfunction in female adolescents with cystic fibrosis (29) or the presence of polycystic ovary (30).

In addition, a complete gynecological history was obtained from each subject, including history of gynecological diseases (salpingitis, endometriosis, other) (yes/no), self-reported menstrual cycle length (days) and previous irregular menstrual cycle (yes/no).

## Anogenital measurements

For each subject, AGD was measured in two ways. First,  $AGD_{AC}$  was measured from the anterior clitoral surface to the center of the anus (Figure 1, point 1 to point 3). Second,  $AGD_{AF}$  was measured from the posterior fourchette to the center of the anus (Figure 1, point 2 to point 3). Measurements were made using a digital caliper (Stainless Steel Digital Caliper, VWR<sup>®</sup> International, LLC, West Chester, PA, USA) and while subjects were in the lithotomy position, with the thighs at a 45° angle to the examination table. To improve precision, two examiners made each of these measurements three times, taking in total 6 measures for  $AGD_{AF}$  and  $AGD_{AC}$ , respectively. The mean of the six measurements was used as the estimate. Neither the examiners nor the support staff had knowledge of any of the women's possible conditions/alterations because the AGD measures were taken before the gynecological examination.

## Statistical analyses

We assessed intra- and inter-examiner variability in the AGD measurements by calculating the coefficient of variation (% CV). We used multiple linear regression analyses to identify predictors of each of the two AGD measurements. Covariates initially examined as predictors of AGD measurements were: age, height, weight, body mass index (BMI;  $\text{kg}/\text{m}^2$ ), age at menarche, self-reported sexually transmitted diseases (STD), taking any medication (antibiotics or antihistamines; yes/no) and hormonal contraception (yes/no). When inclusion of a potential covariate resulted in a change in the  $\beta$ -coefficient of < 10%, the variable was not retained in final models. Adjusted odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated using logistic regression. All tests were two-tailed and the level of statistical significance was set at

0.05. Statistical analyses were performed with the statistical package IBM SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, USA).

## Results

Table 1 shows the general characteristics of young women attending the MYWS. The MYWS study population was quite homogeneous. Participants were nulliparous, mostly in good or excellent health, with neither self-reported STD, nor injuries in the genital region, nor transfusions. None of the women had been diagnosed with salpingitis or endometriosis. Only one woman presented abnormality of the uterus (bicornuate uterus). Sixty-five percent of the young women reported having ever had irregular menstrual cycles. In terms of ovarian morphology, 43% of the women presented < 6 ovarian follicles and 57% ≥ 6 ovarian follicles. Women with < 6 follicles had a mean [ $\pm$  standard deviation (SD)] AGD<sub>AF</sub> of 35.3 (5.3) mm and AGD<sub>AC</sub> of 77.3 (9.7) mm. Women with ≥ 6 follicles had a mean AGD<sub>AF</sub> of 39.4 (6.5) mm and AGD<sub>AC</sub> of 82.6 (10.7) mm.

The distributions of both AGD<sub>AC</sub> and AGD<sub>AF</sub> were approximately normal (Figure 2a, b). As expected, AGD<sub>AC</sub> and AGD<sub>AF</sub> were correlated [Pearson correlation ( $r$ ) = 0.40,  $p < 0.0001$ ] (Figure 3). In the multivariate analyses, there was a significant positive association between BMI and both AGD measures (both  $p < 0.01$ ). Hormonal contraception was associated with shorter AGD measurements (both  $p < 0.05$ ) (Table 2). None of the other covariates were significantly associated with either AGD measurement.

As seen in Table 3, both  $AGD_{AF}$  and  $AGD_{AC}$  were positively associated with the presence of  $\geq 6$  ovarian follicles. We also examined the association between having  $< 6$  or  $\geq 6$  ovarian follicles and both AGD measurements stratified in tertiles (33 women in each group). Both AGD measures were significantly associated with having  $\geq 6$  ovarian follicles after controlling for the same covariates used in the linear regression models. Women with AGD in the upper tertile of the  $AGD_{AC}$  distribution, compared to the lowest tertile were more likely to have  $\geq 6$  ovarian follicles compared to  $< 6$  follicles (Odds ratio: 3.0, 95% CI 1.1, 8.6). Similarly, women in the middle and upper tertiles of the  $AGD_{AF}$  distribution, compared to the lowest tertile, were three and six times more likely to have  $\geq 6$  ovarian follicles compared to  $< 6$  follicles [Odds ratio: 3.2 (95% CI 1.1, 8.8) and 6.0 (95% CI 2.0, 17.6), respectively]. Neither AGD measurement was statistically significantly associated with any of the other reproductive outcomes.

#### Within and between-examiner variability

Intra-examiner coefficients of variation for both AGD measurements were below 3%, and inter-examiner coefficients of variation for  $AGD_{AC}$  and  $AGD_{AF}$  were 4.9% and 10%, respectively. Using a mixed model, the interclass correlations were 0.84 (95% CI 0.76, 0.89) and 0.61 (95% CI 0.41, 0.74) for  $AGD_{AC}$  and  $AGD_{AF}$ , respectively.

#### Discussion

This is the first study to measure AGD in adult women and examine the relationships between AGD and female reproductive system characteristics. Both AGD measures were positively and strongly associated with the presence of greater ovarian follicular number. Moreover, a woman with  $AGD_{AC}$  or  $AGD_{AF}$  in the highest tertile of the distribution was 3 and 6 times, respectively, as likely to have  $\geq 6$  ovarian follicles as a

woman with an AGD<sub>AC</sub> or AGD<sub>AF</sub> in the lowest tertile. This underscores the possible clinical implications of the associations that we are reporting here.

Although we typically find that in men AGD measurements are not sensitive to physiologic and lifestyle factors [22], in the current study population the use of hormonal contraception was associated with shorter measures in both AGD measurements (p values <0.05). One immediate consequence of that finding is that, in females, it may be necessary to control not only for body size (height or BMI) as in men, but also for hormonal status in studies seeking associations with AGD measurements. In our study population, 74% (n=29) of the young women taking hormonal contraception reported irregular menstrual cycles in the previous three months. However, no association was found between AGD measurements and irregular menstrual cycle. Therefore we could speculate that hormonal intake might be related to the AGD measurements. To our knowledge, this is the first time this association has been reported in humans.

Recently, Dusek and Bartos [31] examined the effect of the stage of the oestrous cycle on the AGD in female mice and showed that AGD varied during the oestrous cycle, and suggesting that female genital morphology systematically varied within the oestrous cycle. Unfortunately, all the AGD measures in our study were taken during the early follicular phase, so that we cannot assess that hypothesis. Nonetheless, it opens a door to the possibility that hormonal changes (including hormonal contraception) could result in small fluctuations in the morphology of the female external genitalia. Longitudinal study measuring AGD within women at multiple points in the cycles is needed to address this possibility.

Alternatively, it has been suggested that women using hormonal contraception are somewhat more fertile than women who do not [32]. In many mammalian species females with shorter AGD are more fertile [33,34]. Therefore, it is possible that the shorter AGD we observed in women using hormonal contraceptives reflects increased fertility, rather than a direct effect of hormone use on AGD.

As multiple animal studies have shown, the female reproductive tract is susceptible to virilization by exogenous androgen exposure prior to, as well as during, the in utero masculinization programming window (MPW) [5-7]. This prenatal hyperandrogenism results in enlarged cystic ovaries, anovulation or increases ovarian follicular recruitment in female offspring [3,4,7,35]. Excessive prenatal androgens (either endogenous or exogenous) can produce a polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotype in animal models, furthermore [35,36]. As such, it has been widely hypothesized that the etiology of PCOS in humans may include excess prenatal androgen exposure [37]. Pregnant women with PCOS have elevated circulating concentrations of androgens at mid-gestation, which may increase fetal androgen exposure, and female offspring of PCOS mothers are at increased risk of altered ovarian development and function [38,39]. Long-term follow-up studies are required to determine whether this excessive exposure resulted in long-term changes in ovarian function and/or alterations in reproductive function. Here, we do not examine PCOS per se, however we do demonstrate that AGD, a purported biomarker of prenatal androgen exposure, is associated with increased ovarian follicle number.

With regard to reproducibility of follicle count estimated by transvaginal ultrasound, it has been shown that determination of follicle count by transvaginal ultrasound results in



acceptable intra- and inter- observer variability [40]. While there is undoubtedly some inter-cycle variability of follicle count, it is considered to be of little clinical significance, for example, in predicting the response in in vitro fertilization [41]. Several articles have previously defined having  $\geq 6$  or  $> 12$  ovarian follicles as multifollicular [28,29] or polycystic ovaries [30], respectively. We were unable to look at women with polycystic ovaries separately due to small numbers; only 10 women met this criterion. We chose instead to use the cutoff for multifollicular ovary ( $\geq 6$ ), a cutoff which several studies suggest may have clinical relevance [28,29,30].

We found significant positive associations between both  $AGD_{AF}$  and  $AGD_{AC}$  and the presence of greater ovarian follicle number, which could indicate a common fetal origin between longer AGD and greater follicular recruitment. In fact, in animal models, an association between prenatal exposures to androgen excess and an increase in ovarian follicular recruitment [3,4,7] and longer AGD measurement [7] has been reported.

All previous published studies on human female infants have measured both  $AGD_{AF}$  and  $AGD_{AC}$  [19,20,23,25-27]. Callegari et al. [23] also calculated the ratio (i.e:  $AGD_{AF}/AGD_{AC}$ ) both, in premature/full-term newborn infants and newborn infant girls with congenital adrenal hyperplasia, reporting a relatively higher ratio among subjects with that condition. This result supports the hypothesis that androgen exposure in utero may affect measures of the anogenital region in human females. Callegari et al. [23] also took both AGD measurements on a small number of pregnant women (n=10), reporting the first such data, to the best of our knowledge. With all the possible limitations regarding study population and methodologies, our young women presented longer  $AGD_{AF}$  and shorter  $AGD_{AC}$  compared to those ten pregnant women.

We had only a few cases of clinically diagnosed PCOS in our study population; therefore we were unable to explore the relationship between that condition and the AGD measures. A larger and more diverse population or another type of study design (case-control) would add much more information on whether androgen action during early fetal life exerts a fundamental influence on the female reproductive tract in humans, as has been demonstrated in rodents.

Our population was small and limited in age and ethnicity, and thus cannot provide normative values for human female AGD measurements. AGD measures were well tolerated by all subjects, quick to perform, with acceptable intra- and inter-examiner reliability. We plan to assess reproductive hormones in a future publication. A finding of higher FSH and/or low inhibin-B, estradiol or free testosterone with shorter or longer AGD would lend support to the association between AGD and female reproductive system characteristics reported here.

In human males, shorter AGD in adulthood has been associated with poorer semen quality [21,22] and infertility [21] suggesting a common origin, including a disruption of testicular development in utero, as suggested by the testicular dysgenesis syndrome hypothesis [42,43]. As hypothesized, this syndrome, although potentially multifactorial, may be caused by exposure to EDC during the MPW [18].

Recently, Buck Louis et al. [44] suggested a similar paradigm for human females, the ovarian dysgenesis syndrome, which the authors define as alterations in ovarian structure or function that may manifest as fecundity impairments, gynecologic disorders, gravid diseases or later onset of adult diseases. Environmental exposures,

particularly EDC, may be related to in utero origin of gynecologic outcomes, which in turn would be associated with later onset of adult diseases.

## **Conclusions**

Animal studies have shown that the female reproductive tract is susceptible to virilization by exogenous androgen exposure prior to, as well as during, the MPW that is determined by androgen action [6]. Our data demonstrate associations between the two measurements of AGD we examined and an increase in ovarian follicle number. Our results suggest, therefore, that the androgenic environment during early fetal life may exert a fundamental influence on both AGD and female reproductive system characteristics in humans.

If AGD (adjusted for body size) is determined prenatally in humans as in rodents, a longer female AGD in adulthood should reflect a longer AGD at birth, which in turn may reflect increased androgen exposure in utero. Therefore, both greater follicular recruitment and longer AGD in adulthood - assuming that AGD is a stable finding in humans throughout their lives - may reflect a common origin in utero, resulting in alterations of the developing female reproductive tract.

**E-mail addresses of all authors:**

JM: [jaime.mendiola@um.es](mailto:jaime.mendiola@um.es)

MR: [manoliroca@yahoo.es](mailto:manoliroca@yahoo.es)

LMA: [lidia.minguez1@um.es](mailto:lidia.minguez1@um.es)

MPME: [mariapilarmiraescolano@yahoo.es](mailto:mariapilarmiraescolano@yahoo.es)

JJLE: [jlopez@umh.es](mailto:jlopez@umh.es)

ESB: [emily\\_barrett@urmc.rochester.edu](mailto:emily_barrett@urmc.rochester.edu)

SHS: [shanna.swan@mssm.edu](mailto:shanna.swan@mssm.edu)

AMTC: [amtorres@um.es](mailto:amtorres@um.es)

**List of Abbreviations**

AGD: anogenital distance; AGD<sub>AC</sub>: anogenital Distance from the center of the anus to the anterior clitoral surface; AGD<sub>AF</sub>: anogenital Distance from the center of the anus to the posterior fourchette; BMI: body mass index; BPA: bisphenol A; EDC: endocrine-disrupting chemicals; MPW: masculinization programming window; MYWS: Murcia Young Women's Study; PCOS: polycystic ovary syndrome; STD: sexually transmitted diseases.

**Competing interests**

The author(s) declared no conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

**Author's contributions:** MR, JM, SHS and AMTC designed and initiated the current study. MR, LMA and JM were responsible for collecting the samples and the interview data. LMA and MR coordinated the current study. JJLE and MPME were responsible for statistical analysis. ESB, MPME, JM, MR, SHS and AMTC were responsible for writing the draft version of manuscript. All authors commented on and approved the final manuscript.

**Acknowledgements:** This work was supported by “Fundación Séneca, Región de Murcia, Agencia Regional de Ciencia y Tecnología, grant no. 08808/PI/08”, “Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III (FIS) grant nº PI10/00985” and a research grant from Gestión Clínica Avanzada SLU. The authors gratefully acknowledge Dr. C. Millán, L. Sarabia, C. Ruiz, E. Belmonte and all the USP Dexeus Murcia clinic staff for their assistance in data collection; and the young women of the study for their participation. We also thank K.J. Ruiz-Ruiz and E. Estrella for their work on database management. In memory of our beloved friend and colleague, Maria Fuensanta Mas Tornel.

## References

1. Foster PM: **Disruption of reproductive development in male rat offspring following *in utero* exposure to phthalate esters.** *Int J Androl* 2006, **29**:140-147.
2. Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley GT, Guillette L: **Adverse effects of environmental anti-androgens and androgens on reproductive development in mammals.** *Int J Androl* 2006, **29**:96-104.
3. Smith P, Steckler TL, Veiga-Lopez A, Padmanabhan V: **Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone and dihydrotestosterone on follicular recruitment, depletion of follicular reserve, and ovarian morphology in sheep.** *Biol Reprod* 2009, **80**:726-736.
4. Steckler T, Wang J, Bartol FF, Roy SK, Padmanabhan V: **Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment.** *Endocrinology* 2005, **146**:3185-3193.
5. Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray LE Jr: **Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study.** *Toxicol Sci* 2002, **65**:71-86.
6. Dean A, Smith LB, Macpherson S, Sharpe RM: **The effect of dihydrotestosterone exposure during or prior to the masculinization programming window on reproductive development in male and female rats.** *Int J Androl* 2012, **35**:330-339.

7. Wu XY, Li ZL, Wu CY, Liu YM, Lin H, Wang SH, Xiao WF: **Endocrine traits of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female Sprague-Dawley rats.** *Endocr J* 2010, **57**:201-209.
8. Guillette LJ Jr, Moore BC: **Environmental contaminants, fertility, and multioocytic follicles: a lesson from wildlife?** *Semin Reprod Med* 2006, **24**:134-141.
9. Karavan JR, Pepling ME: **Effects of estrogenic compounds on neonatal oocyte development.** *Reprod Toxicol* 2012, **34**:51-56.
10. Zhang HQ, Zhang XF, Zhang LJ, Chao HH, Pan B, Feng YM, Li L, Sun XF, Shen W: **Fetal exposure to bisphenol A affects the primordial follicle formation by inhibiting the meiotic progression of oocytes.** *Mol Biol Rep* 2012, **39**:5651-5657.
11. Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, Thomas S, Thomas BF, Hassold TJ: **Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse.** *Curr Biol* 2003, **13**:546-553.
12. Rivera OE, Varayoud J, Rodríguez HA, Muñoz-de-Toro M, Luque EH: **Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb.** *Reprod Toxicol* 2011, **32**:304-312.
13. Rodríguez HA, Santambrosio N, Santamaría CG, Muñoz-de-Toro M, Luque EH: **Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary.** *Reprod Toxicol* 2010, **30**:550-557
14. Hunt PA, Lawson C, Gieske M, Murdoch B, Smith H, Marre A, Hassold T, Vandervoort CA: **Bisphenol A alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of the rhesus monkey.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, **109**:17525-17530.

15. Moyer B, Hixon ML: **Reproductive effects in F1 adult females exposed in utero to moderate to high doses of mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP).** *Reprod Toxicol* 2012, **34**:43-50.
16. Hotchkiss AK, Parks-Saldutti LG, Ostby JS, Lambright C, Furr J, Vandenberg JG, Gray LE Jr.: **A mixture of the "anti-androgens" linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion.** *Biol Reprod* 2004, **71**:1852-1861.
17. Macleod DJ, Sharpe RM, Welsh M, Fiskens M, Scott HM, Hutchison GR, Drake AJ, van den Driesche S: **Androgen action in the masculinization programming window and development of male reproductive organs.** *Int J Androl* 2010, **33**:279-287.
18. Scott HM, Hutchison GR, Jobling MS, McKinnell C, Drake AJ, Sharpe RM: **Relationship between androgen action in the "male programming window," fetal Sertoli cell number, and adult testis size in the rat.** *Endocrinology* 2008, **149**:5280-5287.
19. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S, Teague JL; Study for Future Families Research Team: **Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure.** *Environ Health Perspect* 2005, **113**:1056-1061.
20. Swan SH: **Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans.** *Environ Res* 2008, **108**:177-184.
21. Eisenberg ML, Hsieh MH, Walters RC, Krasnow R, Lipshultz LI: **The relationship between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men.** *PLoS One* 2011, **6**:e18973.



22. Mendiola J, Stahlhut RW, Jørgensen N, Liu F, Swan SH: **Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in Rochester, New York.** *Environ Health Perspect* 2011, **119**:958-963.
23. Callegari C, Everett S, Ross M, Brasel JA: **Anogenital ratio: measure of fetal virilization in premature and full-term newborn infants.** *J Pediatr* 1987, **111**:240-243.
24. Goldman AS, Bongiovanni AM: **Induced genital anomalies.** *Ann N Y Acad Sci* 1967, **142**:755-767.
25. Salazar-Martinez E, Romano-Riquer P, Yanez-Marquez E, Longnecker MP, Hernandez-Avila M: **Anogenital distance in human male and female newborns: a descriptive, cross-sectional study.** *Environ Health* 2004, **3**:8.
26. Phillip M, De Boer C, Pilpel D, Karplus M, Sofer S: **Clitoral and penile sizes of full term newborns in two different ethnic groups.** *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996, **9**:175-179.
27. Sathyanarayana S, Beard L, Zhou C, Grady R: **Measurement and correlates of ano-genital distance in healthy, newborn infants.** *Int J Androl* 2010, **33**:317-323.
28. Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, Morris DV, Price J, Jacobs HS: **Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone.** *Lancet* 1985, **2**:1375-1379.
29. Galli-Tsinopoulou A, Moudiou T, Mamopoulos A, Karamouzis M, Nousia-Arvanitakis S: **Multifollicular ovaries in female adolescents with cystic fibrosis.** *Fertil Steril* 2006, **85**:1484-1487.

30. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D: **Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions.** *Hum Reprod Update* 2003, **9**:505-514.
31. Dusek A, Bartos L: **Variation in Ano-Genital Distance in Spontaneously Cycling Female Mice.** *Reprod Domest Anim*, in press.
32. Tietze C: **Differential fecundity and effectiveness of contraception.** *Eugen Rev* 1959, **50**:231-237.
33. Bánszegi O, Szenczi P, Dombay K, Bilkó A, Altbäcker V: **Anogenital distance as a predictor of attractiveness, litter size and sex ratio of rabbit does.** *Physiol Behav* 2012, **105**:1226-1230.
34. Monclús R, Blumstein DT: **Litter sex composition affects life-history traits in yellow-bellied marmots.** *J Anim Ecol* 2012, **81**:80-86.
35. Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA: **Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome?** *Hum Reprod Update* 2005, **11**:357-374.
36. Forsdike RA, Hardy K, Bull L, Stark J, Webber LJ, Stubbs S, Robinson JE, Franks S: **Disordered follicle development in ovaries of prenatally androgenized ewes.** *J Endocrinol* 2007, **192**:421-428.
37. Sloboda DM, Hickey M, Hart R: **Reproduction in females: the role of the early life environment.** *Hum Reprod Update* 2011, **17**:210-227.
38. Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Perez-Bravo F, Recabarren SE: **Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization.** *Hum Reprod* 2002, **17**:2573-2579.

39. Sir-Petermann T, Codner E, Maliqueo M, Echiburú B, Hitschfeld C, Crisosto N, Pérez-Bravo F, Recabarren SE, Cassorla F: **Increased anti-mullerian hormone serum concentrations in prepubertal daughters of women with polycystic ovary syndrome.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**:3105-3109.
40. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, Habbema JD, Looman CW, Te Velde ER: **Quantitative transvaginal two- and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts.** *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002, **20**:270-275.
41. Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER: **Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization.** *Fertil Steril* 2004, **81**:35-41.
42. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM: **Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects.** *Hum Reprod* 2001, **16**:972-978.
43. Sharpe RM, Skakkebaek NE: **Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects.** *Fertil Steril* 2008, **89**:33-38.
44. Buck Louis GM, Cooney MA, Peterson CM: **The ovarian dysgenesis syndrome.** *J. Dev. Orig. Health Dis* 2011, **2**:25-35.

Table 1. Characteristics of young women participating in the Murcia Young Women's Study (MYWS)<sup>(1)</sup>

	Mean (SD)	Median (5-95)
Age (years)	20.0 (1.2)	20.0 (18.0 - 22.0)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.8 (3.1)	21.3 (17.7 - 28.8)
Age at menarche	12.7 (1.3)	13.0 (11.0 - 15.0)
Day of cycle at clinic	3.9 (2.6)	3.5 (1.0 - 6.0)
Menstrual cycle length <sup>a</sup>	30.9 (7.6)	30 (25.0 - 44.0)
Anogenital distance (AGD <sub>AC</sub> ) (mm)	80.4 (10.5)	79.2 (59.5 - 96.1)
Anogenital distance (AGD <sub>AF</sub> ) (mm)	37.7 (6.3)	37.2 (27.9 - 48.6)
AGD <sub>AF</sub> / AGD <sub>AC</sub>	0.47 (0.09)	0.46 (0.36 - 0.60)
	Percentage of women (%)	
Caucasian	98.0	
Cigarette smoking <sup>b</sup>	34.0	
Alcohol intake (liquor) <sup>c</sup>	31.6	
Have had:		
Good or excellent general health <sup>d</sup>	92.0	
Diabetes or thyroid disease	2.0	
Using hormonal contraception <sup>e</sup>	39.8	

<sup>1)</sup> One woman with no physical examination performed (n=99)

<sup>a)</sup> in days (number of subjects = 36)

<sup>b)</sup> Mean number  $\pm$  (SD) of cigarettes per week, 39.4 $\pm$ (29.9), if a smoker.

<sup>c)</sup> Mean number  $\pm$  (SD) of drinks (330 cc) per week, 2.6 $\pm$ (2.5), if a drinker.

<sup>d)</sup> Question was 'How would you describe your own health?'

<sup>e)</sup> Oral contraceptives or vaginal ring

SD = Standard deviation; (5-95)= 5<sup>th</sup>-95<sup>th</sup> percentile

AGD<sub>AC</sub>: Anogenital Distance from the center of the anus to the anterior clitoral surface

AGD<sub>AF</sub>: Anogenital Distance from the center of the anus to the posterior fourchette

Table 2. Variables related to AGD<sub>AF</sub> and AGD<sub>AC</sub> in multivariate models.

Variable	AGD <sub>AF</sub>			AGD <sub>AC</sub>		
	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	P-value	Unstandardized Coefficients	Standardized Coefficients	P-value
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.82	0.41	< 0.01	1.2	0.34	< 0.01
Hormonal contraception <sup>a</sup>	- 2.4	- 0.20	0.03	- 4.9	- 0.24	0.01

<sup>a</sup> no vs. yes

Table 3. Multivariate analysis for young women's female reproductive system characteristics and AGD<sub>AF</sub> and AGD<sub>AC</sub><sup>(1)</sup>

Variable	AGD <sub>AF</sub>				AGD <sub>AC</sub>			
		95% CI	P-value	R <sup>2</sup>		95% CI	P-value	R <sup>2</sup>
Uterine morphology <sup>a</sup>	- 2.0	(- 9.7, 5.7)	0.60	0.22	1.0	(- 12.6, 14.6)	0.88	0.18
Ovarian morphology								
< 6 ovarian follicles	Ref.				Ref.			
6 ovarian follicles	3.1	(0.96, 5.3)	< 0.01	0.30	4.6	(0.76, 8.5)	0.02	0.23
Menstrual cycle length <sup>b</sup>	0.25	(- 0.24, 0.74)	0.31	0.20	0.46	(- 0.62, 1.5)	0.39	0.23
Irregular menstrual cycle <sup>c</sup>	0.69	(- 1.6, 2.9)	0.55	0.22	0.71	(- 3.3, 4.8)	0.73	0.18

<sup>1)</sup> Controlling for BMI and hormonal contraception

<sup>a)</sup> normal/abnormal

<sup>b)</sup> in days (number of subjects = 36)

<sup>c)</sup> Question was: "Have you ever had an irregular menstrual cycle?" (yes/no)

= Regression coefficient; CI= Confidence interval

Ref.: reference group

Figure 1. Landmarks for two measurements of AGD:  $AGD_{AC}$ , from the anterior clitoral surface to the center of the anus (point 1 to point 3); and  $AGD_{AF}$ , from the posterior fourchette to the center of the anus (point 2 to point 3). Adapted with permission from Sathyanarayana et al. [27].

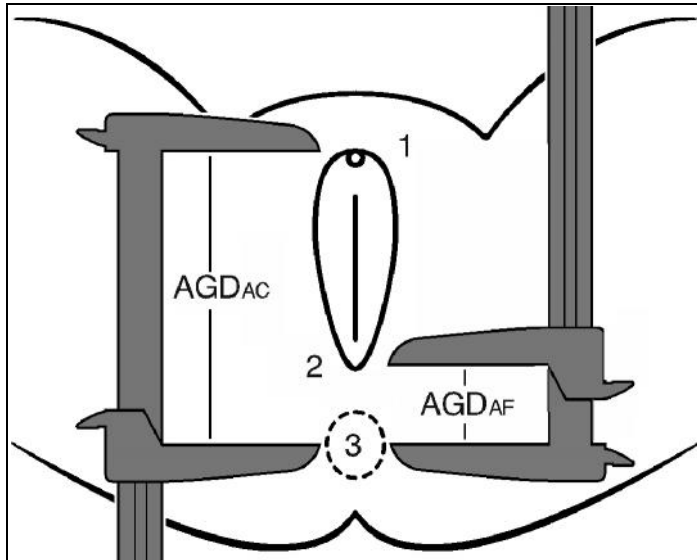
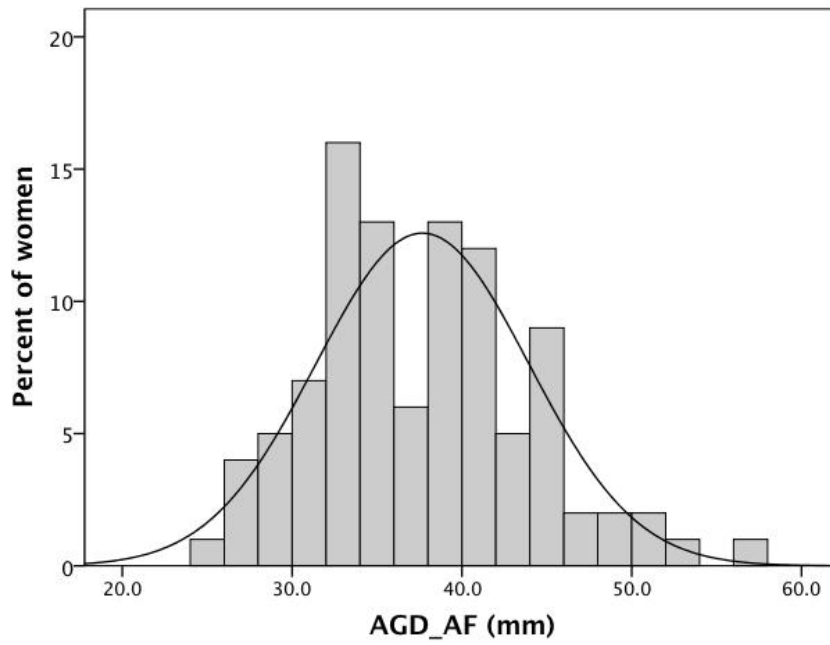


Figure 2. Frequency distributions of (a)  $AGD_{AF}$  and (b)  $AGD_{AC}$  in the MYWS.

a)



b)

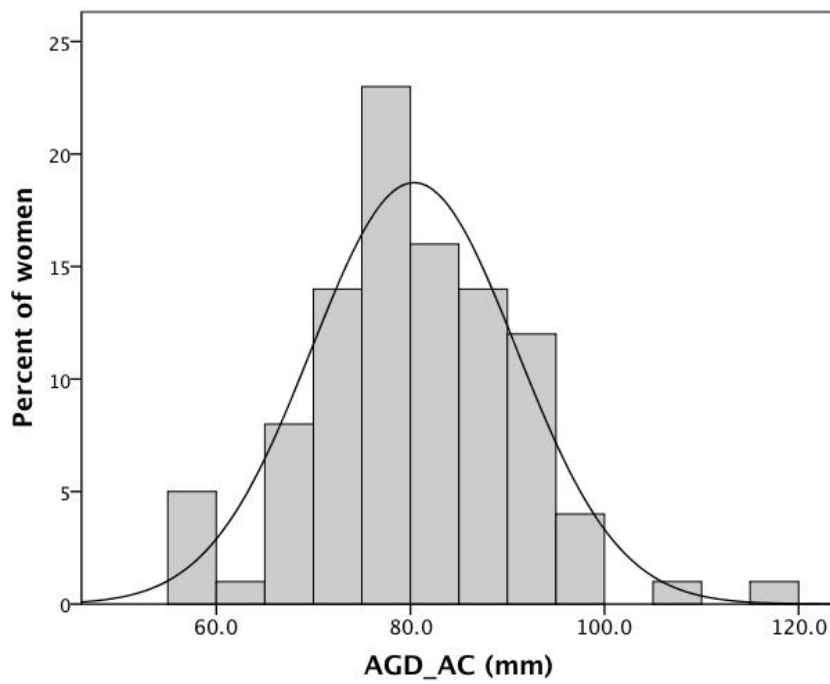
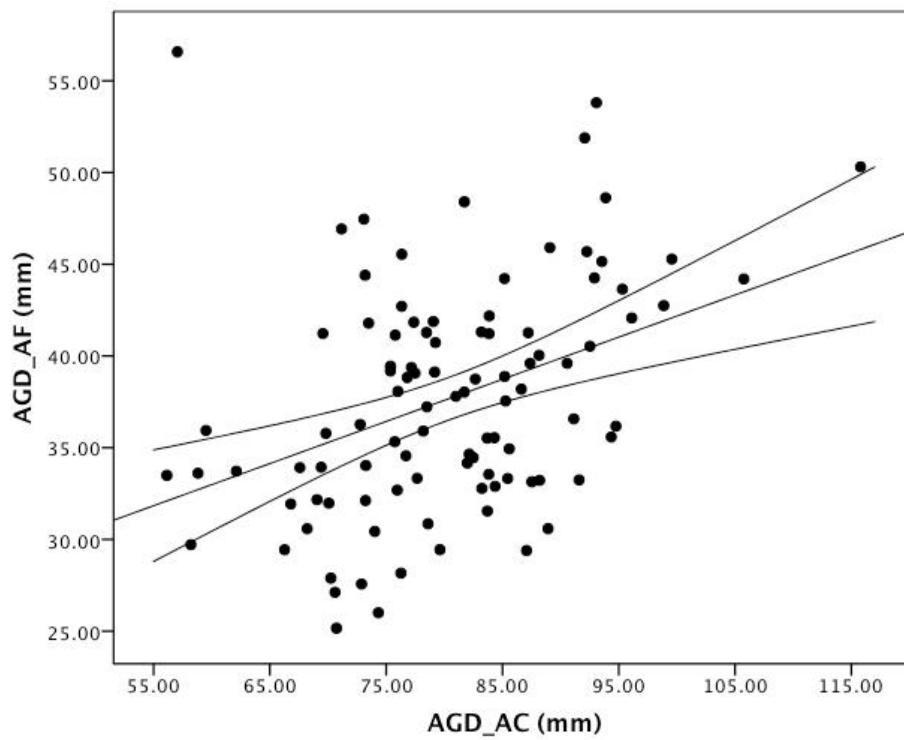


Figure 3. Correlations between  $AGD_{AF}$  and  $AGD_{AC}$  measures in the MYWS.







ELSEVIER

www.sciencedirect.com  
www.rbmonline.com



## LETTER

## Response: Anogenital distance in newborns

To the Editor

We are thankful for Dr Kim and colleagues' letter acknowledging our recent article on the relationship between anogenital distance (AGD) of young women and their mother's gynaecological characteristics before or during pregnancy (Mira-Escolano et al., 2014a, 2014b).

Kim et al. (2014) obtained data on AGD in newborns, showing that male AGD was associated with several anthropometric measures (height, weight and head circumference) and that female AGD was only associated with weight.

We fully agree with them that there are clear associations between anthropometric and AGD measurements in humans, as reported elsewhere (Eisenberg et al., 2012; Kim et al., 2014; Mendiola et al., 2011, 2012; Swan et al., 2005). Nonetheless, we think that the best anthropometric measurement for predicting AGD might vary between study populations (for example, newborns, infants, adolescents, adults) and, of course, must be controlled for in multivariate analyses reporting reproductive or environmental exposure outcomes, for instance.

Our study population consisted of healthy young women between 18 and 23 years old. We explored the associations between several anthropometric measures (height, weight and BMI) and AGD and showed that, in young women, BMI was the best anthropometric measurement predictor of AGD (Mendiola et al., 2012; Mira-Escolano et al., 2014a, 2014b).

Finally, there is a need for more research to understand which are the most strongly associated anthropometric measures in different populations, and we recommend that future studies continue to collect data on multiple measures for both AGD and anthropometric measurements.

## References

Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Walters, R.C., Skakkebaek, N.E., Lipshultz, L.I., 2012. The relationship between anogenital distance and reproductive hormone levels in adult men. *J. Urol.* 187, 594–598.

- Kim, T.H., Lee, H.H., Kim, J.M., Yang, Y.J., Kim, S.Y., Hong, Y.P., 2014. The routine value of anogenital distance as an anthropometric measurement in newborns. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 41, 283–287.
- Mendiola, J., Stahlhut, R.W., Jørgensen, N., Liu, F., Swan, S.H., 2011. Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in Rochester, New York. *Environ. Health Perspect.* 119, 958–963.
- Mendiola, J., Roca, M., Mínguez-Alarcón, L., Mira-Escolano, M.P., López-Espín, J.J., Barrett, E.S., Swan, S.H., Torres-Cantero, A.M., 2012. Anogenital distance is related to ovarian follicular number in young Spanish women: a cross-sectional. *Environ. Health* 11, 90.
- Mira-Escolano, M.P., Mendiola, J., Mínguez-Alarcón, L., Roca, M., Cutillas-Tolín, A., López-Espín, J.J., Torres-Cantero, A.M., 2014a. Anogenital distance of women in relation to their mother's gynaecological characteristics before or during pregnancy. *Reprod. Biomed. Online* 28, 209–215.
- Mira-Escolano, M.P., Mendiola, J., Mínguez-Alarcón, L., Melgarejo, M., Cutillas-Tolín, A., Roca, M., López-Espín, J.J., Noguera-Velasco, J.A., Torres-Cantero, A.M., 2014b. Longer anogenital distance is associated with higher testosterone levels in women: a cross-sectional study. *BJOG* (in press).
- Swan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Ternand, C.L., Sullivan, S., Teague, J.L., 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ. Health Perspect.* 113, 1056–1061.

Maria-Pilar Mira-Escolano

Jaime Mendiola

E-mail address: [jaime.mendiola@um.es](mailto:jaime.mendiola@um.es)

Lidia Mínguez-Alarcón

Alberto M. Torres-Cantero

Department of Health and Social Sciences  
University of Murcia School of Medicine, Spain

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.008>

1472-6483/© 2014 Published by Elsevier Ltd on behalf of Reproductive Healthcare Ltd.

Please cite this article in press as: Maria-Pilar Mira-Escolano, Response: Anogenital distance in newborns, *Reproductive BioMedicine Online* (2014), doi: [10.1016/j.rbmo.2014.09.008](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.09.008)



## ***DIFUSIÓN DE RESULTADOS***

### **Comunicación a Congresos**

**Autores/as:** Mendiola Olivares J, Medina Cascales D, Mira Escolano MP, Mínguez Alarcón L, Cutillas Tolín A, Torres Cantero AM.

**Título:** Distancia anogenital en mujeres jóvenes en relación con sus exposiciones medioambientales prenatales.

**Congreso:** IX Conferencia Nacional de Disruptores Endocrinos.

**Fecha y lugar:** 24, 25 y 26 de junio del 2015. Cartagena.

**Autores/as:** Jaime Mendiola, Maria-Pilar Mira-Escolano, Lidia Mínguez-Alarcón, Ana Cutillas-Tolín, José-Juan López-Espín, Alberto M. Torres-Cantero.

**Título:** Anogenital distance of women in relation to their mother's environmental exposures during pregnancy.

**Congreso:** 8th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters - COW2015.

**Fecha y lugar:** 27, 28, 29 y 30 de abril del 2015. Copenhagen, Dinamarca.

**Autores/as:** MP. Mira Escolano, J. Mendiola, L. Mínguez Alarcón, M. Roca, A. Cutillas Tolín, JJ. López Espín, AM. Torres Cantero.

**Título:** Relación entre distancia anogenital femenina y marcadores indirectos del ambiente hormonal intraútero.

**Congreso:** Congreso Ibero-Americano de Epidemiología y Salud Pública.

**Fecha y lugar:** 4, 5 y 6 de septiembre del 2013. Granada.

**Autores/as:** Mira Escolano, Maria Pilar; Mendiola, Jaime; Mínguez Alarcón, Lidia; Roca, Manuela; Cutillas Tolín, Ana; Melgarejo, Maria.

**Título:** Asociación positiva entre niveles séricos de testosterona y distancia anogenital en mujeres jóvenes.

**Congreso:** VIII Conferencia Nacional de Disruptores Endocrinos

**Fecha y lugar:** 13 de junio de 2013. Granada.

**Autores/as:** Mendiola J, Mínguez-Alarcón L, Mira-Escolano MP, Barret ES, Swan SH, Torres-Cantero AM.

**Título:** Is there an association between anogenital distance and female reproductive system characteristics in humans?

**Congreso:** 39 Symposium Internacional “Fertilidad 2012”

**Fecha y lugar:** 28, 29 y 30 de noviembre del 2012. Barcelona.