



Exposición a Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS) durante el desarrollo gonadal temprano y sus efectos en la diferenciación testicular en ratones adultos CD-1



  
LUISA GONZALEZ CARRANZA  
ALUMNA

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 19 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión de Posgrado:

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ  
DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS  
DRA. MARGARITA DOLORES CHAVEZ SALDAÑA  
DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL  
DE: LUISA GONZALEZ CARRANZA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

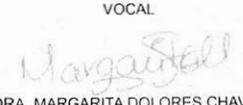
APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS  
  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE  
  
DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL  
  
DRA. MIRIAM FAHIEL CASILLAS AVALOS

VOCAL  
  
DRA. MARGARITA DOLORES CHAVEZ SALDAÑA

SECRETARIO  
  
DR. JOSE MIGUEL BETANCOURT RULE

## Declaración de originalidad

El (La) que suscribe Mtra. Luisa González Carranza, alumno (a) del posgrado Maestría de Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Exposición a Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS) durante el desarrollo gonadal temprano y sus efectos en la diferenciación testicular en ratones adultos CD-1",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante la Comisión de la MBRA y Comité de Sinodales para lo obtención del grado de Maestría es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autorial y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 19 de noviembre del 2020.

Atentamente



Luisa González Carranza

Nombre y firma del alumno

*Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.*



División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
**Exposición a Sulfonato de Perfluorooctano (PFOS) durante el desarrollo gonadal temprano y sus efectos en la diferenciación testicular en ratones adultos CD-1**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Biología de la Reproducción Animal

P R E S E N T A

Biól. Luisa González Carranza

Director de Tesis

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Asesor Interno

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Asesor Externo

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

Instituto Nacional de Medicina Genómica

## Miembros del Comité de tutores



Director de Tesis

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: [ivan.bahena@gmail.com](mailto:ivan.bahena@gmail.com)



Asesor Interno

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: [mundo@xanum.uam.mx](mailto:mundo@xanum.uam.mx)



Asesor Externo

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Correo electrónico: [jreyes@inmegen.gob.mx](mailto:jreyes@inmegen.gob.mx)

## Miembros del jurado de examen

### Presidente:

Dr. Edmundo Bonilla González   
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: mundo@xanum.uam.mx



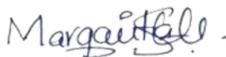
Dra. Miriam Fahiel Casillas Avalos  
Departamento de Biología de la Reproducción Animal  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Correo electrónico: fahiel.ca@gmail.com**



Dr. José Miguel Betancourt Rule  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Correo electrónico: bet@xanum.uam.mx**



Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña  
Instituto Nacional de Pediatría

**Correo electrónico: mdoloreschs@gmail.com**

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular y Toxicología de la Gametogénesis R009 de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa en colaboración con el Instituto Nacional de Medicina Genómica y el Instituto Nacional de Cancerología.

Este estudio fue apoyado por el CONACYT, otorgando la beca a Luisa González Carranza (Núm: 925702 CVU: 925702).

“El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de posgrados de Excelencia del CONACYT (PNPC) registro 003797”.

Al Dr. Avilés Salas Alejandro y al Instituto Nacional de Cancerología, por su apoyo en la preservación de muestras de tejido para el posterior análisis histológico.

## **AGRADECIMIENTOS**

A las personas que siempre me han apoyado, aquellas que me han brindado el impulso para continuar con mis estudios y sobre todo a las personas que siempre confiaron en que lograría llegar hasta este momento de mi vida. Quiero expresar mi gratitud a las siguientes personas:

A mi director de tesis el Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo, quien ha confiado y creído en mí, apoyándome y guiándome en cada paso durante todo este proceso. Siendo no solo mi director, sino también un gran amigo y un buen ejemplo a seguir.

Al Dr. Edmundo Bonilla González por la confianza, el apoyo incondicional y sus valiosos consejos en mi vida como estudiante.

Al Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda por el apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A mi familia: a mis hermanos: Ruth, Emma Edith, Ana, Luis Adrián, Noe y Elizabeth por todo el apoyo incondicional, la confianza que en mi depositaron y la motivación de cumplir mis metas académicas, a mis padres: la Sra. Virginia Carranza Sánchez y el Sr. Luis González Rojas que me enseñaron que se debe luchar por lo que realmente se quiere, a mis sobrinos: Ana pamela, Daniela, Damián, Lesly, Diana y Regina, que me motivan a superarme día con día y alegran mi vida con su presencia.

A la Sra. María Luisa, el Sr. Carlos Urrutia y en especial a Carlos Arturo, que se convirtieron en una segunda familia para mí, por todo el apoyo, la confianza, el amor y la motivación que me brindaron.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, ya que me apoyaron y brindaron sus consejos que fueron significativos para la realización de este trabajo la Maestra Jessica Téllez y Gerardo.

Gracias a mis compañeros de maestría, a los cuales hoy considero unos excelentes amigos, en especial a José Edwin, Andrea y Adyeni quienes me ayudaron y compartieron conmigo todo este proceso en la MBRA, junto con Miguel.

Finalmente dedico todo este trabajo a dos personas muy importantes en mi vida, a mi hermana Ruth quien siempre ha creído en mí, me ha brindado su apoyo incondicional y de la cual yo he seguido el ejemplo de no rendirme y esforzarme hasta el final. Y a mi sobrina Ana Pamela, por la cual mi vida cambio y me ha motivado a seguir adelante.

## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Abreviaturas</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Introducción</b> .....	<b>3</b>
3.1 <u>Histo-anatomía del testículo</u> .....	<u>4</u>
3.2 <u>Células germinales en el ratón</u> .....	<u>5</u>
3.3 <u>Células de Leydig</u> .....	<u>8</u>
3.4 <u>Células de Sertoli</u> .....	<u>9</u>
3.5 <u>Desarrollo y diferenciación sexual en las gónadas de ratón</u> .....	<u>10</u>
3.6 <u>Compuestos perfluorados como contaminantes ambientales y su bioacumulación</u> .....	<u>12</u>
3.7 <u>Trastornos reproductivos masculinos</u> .....	<u>16</u>
3.8 <u>Distancia anogenital e índice gonadosomático</u> .....	<u>17</u>
<b>4. Antecedentes</b> .....	<b>18</b>
<b>5. Justificación</b> .....	<b>20</b>
<b>6. Pregunta de investigación</b> .....	<b>22</b>
<b>7. Hipótesis</b> .....	<b>22</b>
<b>8. Objetivo general</b> .....	<b>22</b>
8.1 <u>Objetivos particulares</u> .....	<u>22</u>
<b>9. Diseño experimental</b> .....	<b>23</b>
<b>10. Metodología</b> .....	<b>24</b>
10. 1 <u>Animales de experimentación</u> .....	<u>24</u>

10.2 <i>Reactivos y compuestos</i> .....	24
10.3 <i>Modelo experimental de exposición gestacional a PFOS</i> .....	24
10.4 <i>Valoración de patrones morfométricos de ratones macho, expuestos durante la gestación</i> ....	25
10.5 <i>Obtención de testículos para evaluar el peso</i> .....	26
10.6 <i>Evaluación de la calidad espermática</i> .....	26
10.7 <i>Evaluación del potencial de fertilización de los ratones CD-1 expuestos a PFOS durante la vida fetal</i> .....	28
10.8 <i>Análisis de imágenes y paquetes estadísticos</i> .....	28
<b>11. Resultados</b> .....	<b>29</b>
<b>12. Discusión</b> .....	<b>39</b>
<b>13. Conclusiones</b> .....	<b>42</b>
<b>14. Perspectivas</b> .....	<b>43</b>
<b>15. Anexos</b> .....	<b>44</b>
<b>16. Bibliografía</b> .....	<b>45</b>

## 1. Resumen

En los últimos años se ha registrado una alta incidencia de problemas de fertilidad y defectos en el desarrollo sexual masculino, que podría estar relacionado a la contaminación ambiental. El desarrollo embrionario y fetal comprende una serie de eventos importantes para la formación de un nuevo individuo, siendo un período susceptible a agresiones químicas por contaminantes. El sulfonato de perfluorooctano (PFOS), es un contaminante ambiental que en el humano ha sido detectado en suero sanguíneo, líquido amniótico, sangre del cordón umbilical y diferentes órganos como hígado, riñón y en pequeñas concentraciones en testículo y cerebro. Tanto el humano, como muchas otras especies animales están expuestas a PFOS desde etapas tempranas del desarrollo embrionario. En el varón se ha descrito que PFOS altera la proporción de espermatozoides normales, disminuye la concentración espermática y altera la concentración de hormonas sexuales. Sin embargo, actualmente no existen estudios que describen las alteraciones en el individuo macho causadas por la exposición a PFOS durante la gestación, por lo que en, este trabajo se utilizó un modelo murino, para evaluar las alteraciones en el crecimiento, desarrollo sexual y calidad espermática de ratones macho expuestos a PFOS durante el desarrollo fetal. Se obtuvieron ratones hembra gestantes de la cepa CD-1, a las cuales se les administró una dosis de PFOS (5 mg/kg/día) por vía intraperitoneal en las etapas 10.5, 12.5 y 16.5 dpc, que abarcan el periodo de gametogénesis gestacional en las crías. Demostrando que la exposición gestacional a PFOS puede alterar patrones morfométricos en la descendencia masculina como la talla y la distancia anogenital, además, en ratones de 90 días se encontraron alteraciones en la viabilidad, movilidad y concentración espermática. y aunque no afecta la capacidad reproductiva, se encontró una disminución en el número de crías, que puede ser explicada por la afectación en la calidad espermática.

## **2. Abreviaturas**

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ALC** Células de Leydig Adultas

**CG** Cresta Gonadal

**PLC** Células Progenitoras de Leydig

**CGP** Células Germinales Primordiales

**CGT** Células Germinales Testiculares

**dpc** Después del coito

**dpp** Después del parto

**E** Estadio

**FSH** Hormona folículo estimulante

**ILC** Células de Leydig Inmaduras

**INSL3** Factor 3 similar a la Insulina

**LH** Hormona luteinizante

**LHR** Receptor de la Hormona luteinizante

**CPF** Compuestos perfluorados

**PFOS** Sulfonato de Perfluorooctano

**OMS** Organización Mundial de la Salud

**SDT** Síndrome de Disgenesia Testicular

**SSC** Células Madre Espermatogoniales

**T** Testosterona

### **3. Introducción.**

Durante las últimas 5 décadas, las estadísticas indican un incremento dramático en relación con trastornos reproductivos masculinos humanos [1]. Actualmente, se estima que del 30 a 40% de los casos de infertilidad son atribuibles a problemas con el varón. Se ha documentado que, en etapa reproductiva, dónde de 2 a 8 de cada 100 hombres presentarán un problema de subfertilidad [2]. Dichos trastornos pueden relacionarse con algunos padecimientos como son la criptorquidia e hipospadias, así como en varones adultos jóvenes (espermatogénesis deteriorada y cáncer de células germinales testiculares (TGCC), entre otros. Se ha planteado como hipótesis que estos trastornos son entidades subyacentes asociadas con la aparición del síndrome de disgenesia testicular (SDT) [1], con un origen común en la vida fetal, quizás relacionado con deficiencias sutiles en la producción o acción de andrógenos fetales (testosterona) o el descontrol en algunas vías de diferenciación [3]. La motivación original para esta hipótesis fue el descubrimiento de que el TGCC que ocurre en hombres jóvenes, surge debido a una falla de las Células Germinales Fetales (gonocitos) para diferenciarse normalmente [3].

Se ha indicado que el TGCC representa el 98% de todas las neoplasias malignas testiculares [4]. Tanto la criptorquidia como las hipospadias son defectos que afectan a los recién nacidos varones. En México, hasta la fecha no se cuenta con estudios epidemiológicos contundentes; aunque a nivel mundial se reporta entre 1.6% y 9%, de acuerdo con estudios prospectivos en niños a término, respectivamente [4]. La frecuencia de SDT sigue siendo en gran medida desconocida debido a su complejidad. Se sospecha que el estilo de vida y factores ambientales pueden desencadenar problemas de diferenciación. Además, polimorfismos genéticos, así como otras aberraciones, pueden dar lugar a que ciertas personas sean particularmente susceptibles a posibles alteraciones que tengan origen por la exposición a disrupciones endocrinas [1].

### 3.1 Histo-anatomía del testículo

El testículo es la gónada masculina encargada de la producción de gametos (espermatozoides), y de la esteroidogénesis (síntesis de hormonas esteroideas masculinas). Ambos procesos se llevan a cabo en dos compartimentos que se diferencian morfológica y funcionalmente entre sí. El compartimento tubular (túbulos seminíferos) y el compartimento intersticial (intersticio) que se encuentra entre los túbulos seminíferos. Como se muestra en la figura 1, estos compartimentos están conectados entre sí, ya que ambos intervienen en la producción normal del esperma. La función del testículo y sus compartimentos se controlan por el hipotálamo y la glándula pituitaria [5].

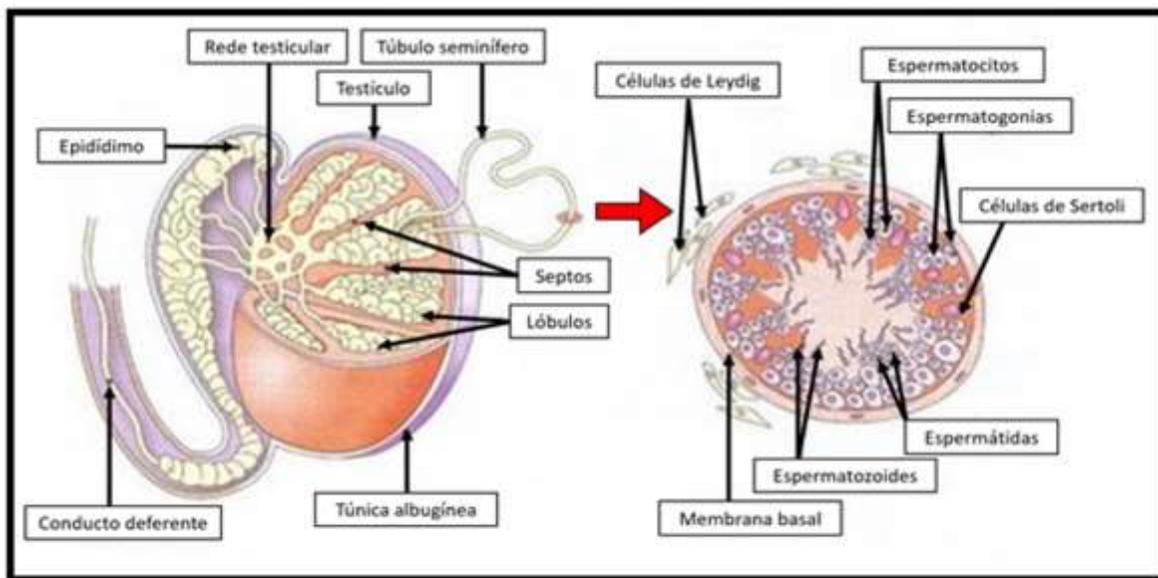


Figura 1. Esquema general del testículo y corte transversal del túbulo seminífero (Modificado de: Duarte, 2012). Muestra las principales estructuras anatómicas de este órgano.

El compartimento intersticial contiene a las células de Leydig, las cuales sintetizan la testosterona testicular y el Factor 3 Similar a la Insulina (INSL3) [5]. También cuenta con células, del sistema inmune como macrófagos y linfocitos, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios, fibroblastos y tejido conectivo laxo. El compartimento tubular representa alrededor del 60-80% del volumen testicular total. En su interior se

encuentran las células germinales y dos tipos de células somáticas (células peritubulares y células de Sertoli). El testículo se divide por tabiques de tejido conectivo en aproximadamente 250-300 lobulillos [5].

Las células peritubulares recubren a los túbulos seminíferos junto con la membrana basal y una capa de colágeno. Estas células se estratifican alrededor del túbulo y forman capas concéntricas que están separadas por las capas de colágeno. Producen varios factores que intervienen en la contractilidad celular y secreción de la matriz extracelular. [5]

### 3.2 Células germinales en el ratón

Durante el desarrollo embrionario las células germinales primordiales (CGP), se diferencian de las células somáticas por sus propiedades morfológicas siguientes; tiene forma oval redonda, por lo general presentan un tamaño grande, núcleo grande, membrana nuclear marcada y tienen numerosas gotas de lípidos en el citoplasma. Cambian morfológicamente dependiendo de la fase de migración en la que se observan [6].

En ratones, las CGP consisten en una población de células presentes en el ectodermo extraembrionario en E5 [7]. Las CGP entran en mitosis y se detectan en la línea primitiva entre la alantoides en desarrollo y el saco vitelino en E7 [8]. Alrededor de E7.75. migran desde el mesodermo alantoideo al endodermo y son transportados con células endodérmicas a medida que se alarga el intestino posterior. En E9.5, las CGP emergen rápidamente de la lámina basal del epitelio intestinal hacia el mesenterio en E9.5. En E10.5 alcanzan la pared dorsal del cuerpo y se mueven dorsalmente y en E11.5 se dirigen a la cresta genital [9]. En el día 12.5 se inicia la formación de los cordones testiculares [10].

La diferenciación de las CGP consta de tres períodos:

1. CGP: es el tipo primario de células madre indiferenciadas que se diferencian hacia gametos.
2. Células madre espermatogoniales (SSC) / células madre oogoniales (OSC)
3. Espermatocito / ovocito [11].

Los gonocitos proliferan hasta aproximadamente E13.5. Desde E13.5 hasta el nacimiento, los gonocitos permanecen en paro mitótico, por lo que en esta etapa no pueden proliferar [12]. Después del nacimiento migran desde el centro del cordón seminífero hacia la periferia y continúan proliferando para formar las células espermatogoniales [13].

El proceso de espermatogénesis se muestra en la figura 2, esta comienza en el día 5 posnatal (PND5), los espermatocitos preleptoteno aparecen en el PND9 y los espermatocitos de cigoteno y paquiteno entre el PND20 y después del PND35, cuando los ratones se aceptan como adultos, las células germinales completas comienzan a aparecer [14].

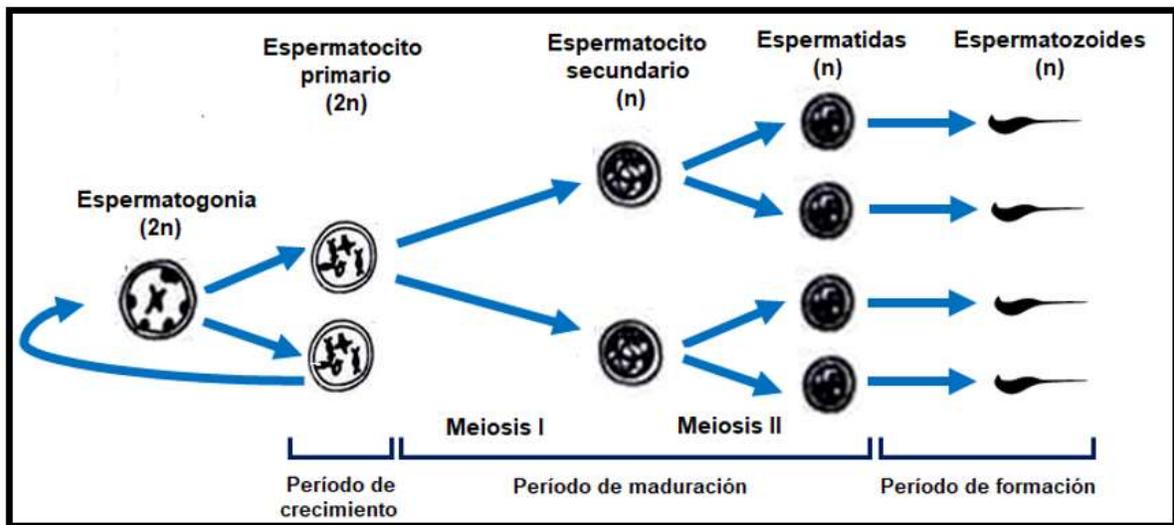


Figura 2. Esquema general de la espermatogénesis del ratón (Modificado de Luense *et al.*, 2016).

La testosterona es la principal hormona para mantener la espermatogénesis [15]. La producción de espermatozoides tiene lugar en el epitelio del túbulo seminífero y se denomina espermatogénesis. El epitelio seminífero como basal y adluminal consta de dos partes. La barrera hemato-testicular (BTB) formada por las células de Sertoli proporciona la división del epitelio del túbulo seminífero en secciones y consta de conexiones estrechas. Los espermatoцитos pasan al compartimento adluminal al comienzo de la fase preleptoteno de la meiosis y atraviesan BTB. La célula de Sertoli proporciona lo necesario para que las células germinales maduren [11].

La última etapa del espermatogénesis es la espermiogénesis, en esta los espermatozoides se forman a partir de espermátidas, con elongación celular, condensación del núcleo, formación de acrosomas y reducción del citoplasma. Estos se almacenan en el epidídimo para entrar en el proceso de maduración, que es necesario para la motilidad y capacidad para fecundar. La maduración se completa en el tracto reproductor femenino y se conoce como capacitación, para que los espermatozoides adquieran la capacidad de fertilizar los ovocitos y finaliza con la reacción del acrosoma, la cual es la fusión del acrosoma y las membranas del ovocito para permitir la fertilización [17]. En el ratón se sabe que la espermatogénesis inicia aproximadamente entre los días 14 - 16 dpp, cada ciclo espermático tiene una duración de 35 días [8].

### 3.3 Células de Leydig

La testosterona (T) es la principal hormona para el mantenimiento del tracto reproductivo masculino y la espermatogénesis. Es producida en el testículo por las células de Leydig, los andrógenos a través de sus receptores inducen la diferenciación sexual masculina en el feto y la maduración sexual en la pubertad. Las células de Leydig se localizan en el compartimiento intersticial del testículo y constan de un desarrollo a través de tres etapas de diferenciación [18].

En el testículo prepuberal las primeras en aparecer son las Células Progenitoras de Leydig (PLC) que derivan de las células madre mesenquimales alrededor del día 14 dp, en el día 28 dp, estas se diferencian en Células de Leydig Inmaduras (ILC), aumentan en número a ~ 13-14 millones por testículo, por lo regular solo se dividen una vez entre los días 28 y 56. Posteriormente, las ILC se diferencian para formar Células de Leydig Adultas (ALC) en el día 60, con una población aproximada de 25 millones por testículo. Conforme las células de Leydig se diferencian, la Hormona Luteinizante (LH) incrementa la capacidad de producción de T [12]. En ratas adultas (90 días) la producción de T aumenta 150 veces más en las células de Leydig en comparación con las células progenitoras de Leydig a los 21 días de edad y cinco veces mayor que la de las ILC a los 35 días de edad, estas son abundantes en la pubertad [19, 20, 21, 22].

### 3.4 Células de Sertoli

Las células de Sertoli participan en la diferenciación, desarrollo y función de los testículos, en la espermatogénesis y en la producción de proteínas, glicoproteínas reguladoras, glicoproteínas estructurales, activadores e inhibidores de proteasas que intervienen en el microambiente de las células madre espermatogoniales. El número de células de Sertoli en los testículos establecidos antes de la pubertad determina la magnitud de la producción de espermatozoides en animales sexualmente maduros [23, 24].

Estas células se localizan en la membrana basal y se extienden a la luz del túbulo seminífero, pueden considerarse como una estructura de soporte del epitelio germinal. Tienen lugar durante la diferenciación morfológica, fisiológica y la maduración de la célula germinal hasta el espermatozoide maduro. Alrededor del 35-40 % del volumen del epitelio germinal está representado por células de Sertoli. Cada célula de Sertoli individual está en contacto morfológico y funcional con un número definido de espermatozoides; en los roedores se asocia aproximadamente con 30 a 50 células en cada etapa del ciclo espermatogénico en el epitelio [5].

En los roedores la proliferación de Sertoli se produce mayormente en embriones y en las primeras etapas después del nacimiento. Alrededor del inicio de la pubertad las células de Sertoli tienen un cambio morfológico y funcional, marcando un cambio de un estado inmaduro y proliferativo a un estado maduro, no proliferativo [23]. La división de las células de Sertoli finaliza cuando las primeras células germinales entran en división meiótica y ya que han creado uniones estrechas entre sí, formando así la barrera hemato-testicular. Esta barrera divide al epitelio seminífero en dos regiones: la región basal y la región adluminal. [5].

### 3.5 Desarrollo y diferenciación sexual en los testículos de ratón

La gónada inicialmente tiene una naturaleza bipotencial, el testículo y el ovario se desarrollan a partir del mismo primordio. Estos órganos darán paso al desarrollo de características sexuales secundarias, por ello la determinación del sexo del embrión tiene lugar durante el desarrollo de los testículos y el ovario [25]. En las primeras etapas del embrión, el sistema urinario y genital están estrechamente relacionados. En la etapa indiferente o bipotencial las características de desarrollo del sistema reproductor femenino y masculino son iguales. En este periodo, el embrión tiene conductos tanto de Wolff como de Müller, que posteriormente se convierten en las estructuras que determinan las características sexuales [11].

El primordio bipotencial de la gónada se desarrolla a partir de la superficie ventromedial del mesonefros. Esta estructura se forma como una capa de células epiteliales celómicas proliferativas. La expresión de la proteína de la región Y determinante del sexo (SRY) en ratones macho, conduce al desarrollo de los testículos, comienza al final de aproximadamente E10.5 días, alcanza su punto máximo a los 11.5 días, este

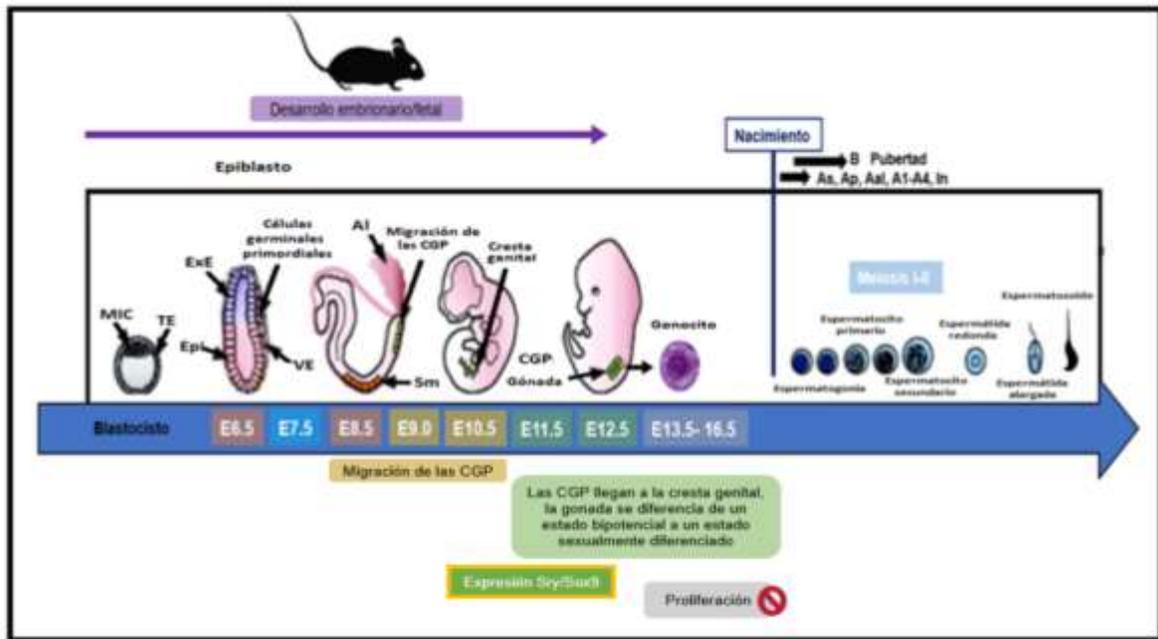


Figura 3. Esquema general del desarrollo y diferenciación de las células germinales y diferenciación gonadal, en ratón. AI, alantoides; Epi, epiblasto; ExE, ectodermo extraembrionario; ICM, masa celular interna; CPG, células germinales primordiales; Sm, somita; TE, trofotodermo; VE, endodermo visceral (Modificado de Saitou *et al.*, 2012).

pico de expresión activa el gen autosómico Sox9, el cual es precursor de la línea celular de Sertoli y finalmente se detiene abruptamente a los 12.5, como se muestra en la figura 3 [26].

Entonces el testículo produce una sustancia inhibidora de Müller (MIS) para la regresión del conducto de Müller [27]. El conducto de Wolff dará origen a la vesícula seminal, el epidídimo, el conducto deferente y el conducto eyaculador, bajo el efecto de los andrógenos testiculares. En ausencia de la expresión de SRY, se producen vías de desarrollo de los ovarios [28].

La diferenciación del tracto reproductivo en el macho está determinada por los andrógenos y la AMH (hormona antimulleriana). Las células de Sertoli producen AMH que induce la regresión del conducto de Müller. Estos andrógenos participan en la diferenciación del canal de Wolff y las glándulas accesorias y son esenciales para el desarrollo testicular. La diferenciación morfológica del canal de Wolff ocurre en el E15 en ratones [29, 30]. En hembras, en ausencia de hormonas testiculares y MIS los conductos de Wolff retroceden (entre los días embrionarios E14.5 y E16.5) mientras que los conductos de Müller se mantienen [11].

### 3.6 Compuestos perfluorados como contaminantes ambientales y su bioacumulación

El incremento en los trastornos reproductivos masculinos coincide con un aumento en la fabricación de compuestos orgánicos artificiales de uso industrial, muchos de los cuales son persistentes y han generado contaminación ambiental [31, 32]. Por ejemplo, los Compuestos Perfluorados (CPF) son un grupo de químicos sintéticos los cuales están constituidos por una cadena de carbonos de longitud variable, en donde los hidrógenos son sustituidos por átomos de flúor y poseen un grupo ácido carboxílico, sulfonato o amida en el extremo de la cadena [33]. Gracias a este enlace carbono-flúor son altamente estables, resistentes a hidrólisis y a altas temperaturas, por lo cual se han utilizado desde la década de 1940 en la fabricación de productos como repelentes de agua y aceite, lubricantes, productos detergentes, recubrimientos para muebles y paquetes de alimentos, ceras, espumas de extinción de incendios entre otros [34, 35].

Dada su elevada persistencia en el ambiente, su distribución global, su potencial bioacumulación y su toxicidad, los CPF han sido considerados contaminantes orgánicos persistentes por la Convención de Estocolmo [27]. Esto ha provocado que la contaminación ambiental por CPF represente un problema global en la actualidad [36]. Los CPF ingresan al cuerpo humano a través de la ingestión, la inhalación y el contacto con productos de consumo de uso común. Dentro del organismo se unen a la albúmina en el torrente sanguíneo y hacia el interior de la célula por transportadores de aniones orgánicos (OAT) [37, 38].

A pesar de que una fracción de CPF es eliminada a través de la orina, estos compuestos se bioacumulan fácilmente en diferentes órganos como el hígado, bazo, riñones, cerebro, testículos y ovarios [39, 40, 41, 42]. Además, reportes recientes, han señalado la presencia de CPF en diferentes muestras biológicas incluyendo orina, plasma seminal, suero y plasma circulante, sangre del cordón umbilical, líquido amniótico, placenta y leche materna [43, 44, 45, 46].

Particularmente, el sulfonato de perfluorooctano (PFOS), el cual, es una molécula en la que todos los átomos de hidrógeno de una cadena de ocho átomos de carbono han

sido reemplazados por átomos de flúor y por un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup> para formar una estructura aniónica estable, como se observa en la figura 4. La combinación con propiedades orgánicas e inorgánicas hace que las sustancias relacionadas con PFOS sean altamente eficaces como agentes tensoactivos sobre las superficies (surfactantes) en una gama de aplicaciones especializadas. Además, PFOS resiste la oxidación, es inerte, inflamable y estable a cualquier otro tipo de descomposición, por lo tanto, una vez liberado al ambiente es persistente. Por cuál es el principal CPF utilizado en la industria [47] [36].

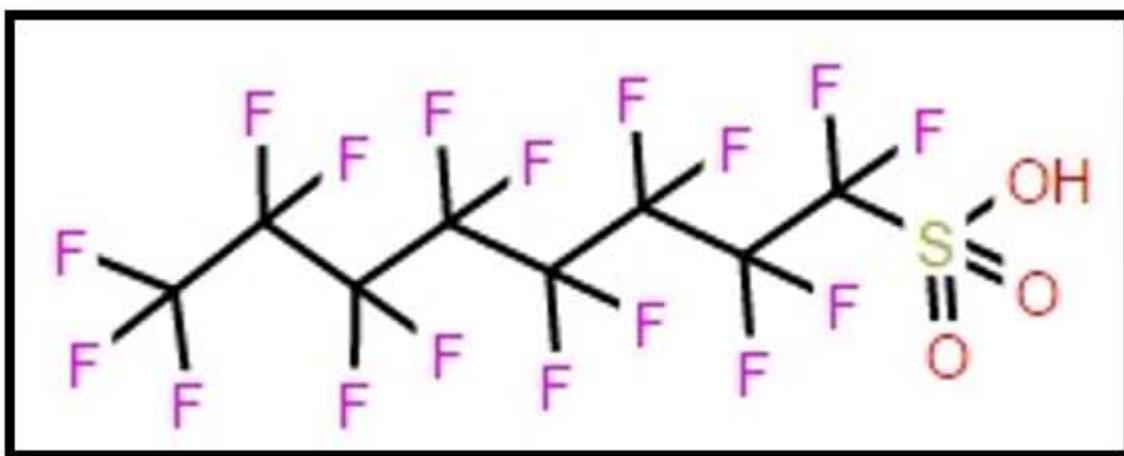


Figura 4. Molécula del sulfonato de perfluorooctano (PFOS)

La Cruz Roja Americana y los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) informan que la exposición promedio de los estadounidenses a PFOS varía de 0.9 ng/ml a más de 100 ng/ml [48, 49, 50]. Del mismo modo, se ha descubierto que las personas que han estado expuestas profesionalmente a los CPF tienen concentraciones de PFOS de hasta 118,000 ng / ml (235.94 µM), valores que son más de 1,000 veces más altos que las concentraciones más altas reportadas por la Cruz Roja Americana y el CDC para la población general de los estadounidenses [51].

En humanos, la vida media de PFOS (3 a 5 años) observada es especialmente preocupante porque esto indica que puede acumularse, lo que puede dar lugar a cargas corporales más altas, en exposiciones repetidas que podrían, a su vez, aumentar el riesgo de posibles efectos adversos para la salud [52] incluida la

disfunción reproductiva masculina [53]. Se ha encontrado en el plasma seminal del 100% de los hombres en una población de Sri Lanka lo que indica que este químico puede acumularse en los testículos [54].

PFOS puede alterar la homeostasis de las hormonas sexuales, y se ha asociado con la incidencia de reabsorciones fetales y la pérdida de la gestación en animales de laboratorio en dosis de 10 mg/kg/día hasta 20 mg/kg/día [55, 56]. Por otro lado, un estudio toxicológico en población norteamericana demostró que cerca del 100% de mujeres embarazadas dieron positivo a diferentes contaminantes ambientales, entre estos PFOS (concentración sérica de 0.30 – 35.8 ng/mL) [57]. Actualmente se ha reportado que durante el embarazo la madre puede exponer al feto a ciertos contaminantes (como los CPF) por los mismos mecanismos por los que los nutrientes son aportados [58].

Estos datos indican que la contaminación con PFOS y otros CPF puede ser una situación globalizada, pero de manera importante, los organismos en desarrollo *intrauterino* podrían estar en contacto con estas moléculas. El aumento en la incidencia de patologías reproductivas en las últimas décadas y en la producción de xenobióticos, así como los hallazgos de contaminación en muestras biológicas nos lleva a plantear, la importancia de investigar los efectos de la exposición a PFOS en desarrollo fetal y su relación con defectos en la diferenciación gonadal y daño al ADN.

En estudios *in vivo* realizados en ratas gestantes se observaron lesiones en células pulmonares ya que las células presentaban lesiones por oxidación y muerte por apoptosis, donde se utilizaron concentraciones de 2.0 mg/kg de PFOS [59, 60]. Domínguez et al., 2016 observaron que el PFOS puede afectar negativamente los parámetros de viabilidad (concentración letal 50 = 32  $\mu$ M) y maduración (inhibición de la maduración 50 = 22  $\mu$ M) de los ovocitos porcinos, así como la viabilidad de las células del *Cumulus* [61]. Raemer y colaboradores en 2012 en 256 hombres evaluaron las concentraciones séricas de PFOS (6.4 – 151 ng/mL) observando una correlación positiva de LH con PFOS en plasma [62].

Chaparro-Ortega y colaboradores en 2018 observaron que PFOS (0.12, 1.2, 12, 120 o 240 $\mu$ M) inhibe la secreción de hormonas esteroideas en cultivos de células porcinas de la granulosa y células de la teca, lo que podría afectar las funciones dependientes de los esteroides sexuales [63]. El ácido perfluorooctanoico (PFOA) causa una producción reducida de T en hombres, en testículo de rata interviene con las enzimas esteroidogénicas de células de Leydig [64]. Qu y colaboradores en 2018 demostraron que PFOS tiene una unión más fuerte a los receptores de estrógenos (ER) en humanos en comparación con *Rattus norvegicus* y *Trucha arcoíris* [65].

### 3.7 Trastornos reproductivos masculinos

En los últimos años se ha observado un incremento en problemas de fertilidad masculina, en hombres de entre 15-35 años. Los trastornos más frecuentes son: criptorquidia, hipospadias (presentes desde el nacimiento) alteraciones en la calidad espermática y cáncer testicular (se desarrollan después de la pubertad). Este último, ha aumentado entre los hombres jóvenes de todo el mundo [3].

Se sabe que una de las causas de infertilidad idiopática masculina es el daño oxidativo al ADN espermático puede originar infertilidad en los hombres [66]. En el proceso de espermiogénesis se da un cambio de histonas por protaminas, junto con ellos la cromatina es superenrollada (toroides). Conforme los espermatozoides continúan su camino por el epidídimo la cromatina sufre una disminución, esta compactación ayuda a la protección contra el asalto exógeno al ADN espermático. Sin embargo, aún puede surgir daño al ADN. Estudios han comprobado que estos niveles de daño son mayores en hombres infértiles, pero también se presentan en hombres fértiles [67].

### 3.8 Distancia anogenital (DAG) e índice gonadosomático

La distancia anogenital (DAG) es un parámetro de valoración que se utiliza en toxicología reproductiva para la diferenciación sexual regulada hormonalmente en roedores [68]. Es sensible a la exposición prenatal antiandrogénica en animales. Se sabe que, en mamíferos incluidos los humanos, los machos tienen una distancia anogenital notablemente más larga que las hembras [69]. Estudios recientes utilizan la DAG para estimar el efecto de las exposiciones a ftalato en el útero en humanos. Se ha observado una asociación negativa entre el índice anogenital y los niveles de diferentes contaminantes ambientales [70]. Se ha observado un vínculo entre la DAG y otros efectos sobre la salud reproductiva en los hombres: una DAG más corta en los hombres adultos se asocia con una mala calidad del semen y con infertilidad. Por lo tanto, el acortamiento en la DAG es un reflejo de alteraciones en el desarrollo embrionario debidas a un desbalance en los niveles de andrógenos [71].

Uno de los primeros signos tangibles de la pubertad es un crecimiento acelerado de las gónadas en ambos sexos. Hasta la pubertad, el crecimiento gonadal y somático muestran un ritmo similar (crecimiento alométrico), es decir, el índice gonadosomático (IGS, gónada peso expresado como tanto por ciento del peso corporal total) es normalmente pequeño y constante. En la pubertad, comienza una fase de crecimiento superalométrico de la gónada, las gónadas crecen más rápido que otros órganos / el resto del cuerpo y por lo tanto aumenta el IGS [69, 70].

#### **4. Antecedentes.**

Los modelos animales y la evidencia epidemiológica en humanos han revelado que las deficiencias en el control hormonal pueden influenciar el desarrollo de TDS, por ejemplo, la deficiencia producción de hormonas esteroideas, la represión de la expresión de RA y la exposición a disruptores endocrinos se atribuyen a la patogénesis de TDS [1].

Los disruptores endocrinos son sustancias exógenas capaces de interferir con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo o la interacción con sus receptores. Algunos CPF comienzan a ser incluidos como parte de esta clasificación. PFOS es capaz de alterar la regulación del eje hipotalámico-pituitario-ovárico y provocar alteraciones en los ciclos menstruales y retardar la ovulación [72, 73]. En estudios que utilizaron como modelo células humanas de carcinoma adrenocortical (H295R) se determinó que PFOS altera la esteroidogénesis, produciendo un incremento en la secreción de estradiol, progesterona y T, de manera importante, este incremento resulta dependiente de la concentración de CPF [74].

Vested y colaboradores en 2013, indicaron una posible asociación entre la exposición a PFOS durante la vida intrauterina y su repercusión en la calidad del semen, volumen testicular y los niveles de las hormonas reproductivas en hombres adultos [75]. Estudios realizados con embriones de hámster demostraron que PFOS afecta su morfología cuando las hembras son expuestas a este durante la gestación, observándose una disminución en la masa corporal al nacimiento y un descenso en el crecimiento de los órganos y del esqueleto [76, 77].

Además, la exposición ambiental a los CPF se relaciona negativamente con la concentración de espermatozoides, el recuento, la motilidad y la morfología [78]. Diferentes estudios en hombres han demostrado que aquellos con altos niveles séricos de PFOS tienen menos espermatozoides normales en su eyaculado, en comparación con aquellos clasificados en el grupo de baja concentración de PFOS [79, 80]. Así

mismo las asociaciones de calidad de semen son generalmente negativas, como los niveles de T total, índice de andrógenos libres (FAI) e inhibina-B [81]. Se sabe que la exposición a PFOS en ratones CD-1 machos conduce a una disminución en los receptores de gonadotropina testicular y a una disminución de la expresión del receptor de la hormona de crecimiento (GHR), inhibinas y activinas [82]. Estos impactos se asocian con un deterioro de la esteroidogénesis testicular que resulta en menos T y, por lo tanto, menos espermatozoides en el epidídimo [83].

En ratas macho dosis orales de CPF pueden aumentar los niveles de estrógeno y/o disminuir los niveles de T [84]. Niveles considerables de CPF se han encontrado en muestras de suero de hombres jóvenes (18 a 25 años), estos niveles de CPF se asocian con una baja calidad espermática [85].

Estudios en roedores han encontrado que, los CPF son capaces de inducir efectos sistémicos como toxicidad hepática, disrupción del metabolismo de lípidos, alteraciones en la función de los sistemas inmune y endocrino, efectos neuro-conductuales adversos; efectos carcinogénicos, favoreciendo el desarrollo de tumores en hígado, riñón, bazo, cerebro, páncreas y testículos; así como, alteraciones en la función reproductiva entre las que se incluyen, cambios en las concentraciones de hormonas sexuales, incremento en la incidencia de abortos espontáneos [86].

Por otro lado, los CPF han sido detectados en sangre del cordón umbilical, líquido amniótico y tejido placentario, esto hecho indica que la exposición a CPF podría darse durante la gestación en diferentes organismos ocasionando problemas en la diferenciación de las CGP [36, 37]. Al respecto estudios retrospectivos han reportado los problemas del desarrollo embrionario y malformaciones, cuando la exposición a los CPF ocurre en periodos críticos de la gestación [34]. Por tal razón resulta importante estudiar los efectos en la diferenciación de células germinales y somáticas, así como el daño al ADN, tras la exposición a PFOS en la diferenciación gonadal temprana.

## 5. Justificación.

Diferentes autores han reportado efectos adversos en la reproducción masculina por de la exposición a PFOS. Estudios *in vivo* en modelos con roedores se han enfocado en la descripción de las alteraciones hormonales observando una disminución en los niveles de T y un aumento en los niveles de estradiol que podrían estar causando alteraciones durante la espermatogénesis. Por otro lado, múltiples estudios utilizan dosis crónicas elevadas (10, 15 y 20 mg/kg/día) durante toda la gestación para observar los efectos teratogénicos en la descendencia, así como en el estudio de la concentración de hormonas esteroideas y tiroideas, o en el estudio de la toxicidad en y células somáticas [87, 88, 89]. Mediante un modelo *in vitro*, se describió la diferenciación de células troncales embrionarias hacia espermatogonias, demostrando que varios CPF son capaces de disminuir la expresión de marcadores de espermatogonias y espermatoцитos primarios, pero no logran identificar en qué estadio de diferenciación ocurre la interrupción de la diferenciación [65]. Si bien todos estos estudios arrojan información relevante sobre los efectos de PFOS en la diferenciación de la gónada masculina, resulta importante desarrollar modelos *in vivo* que logren describir el efecto de una exposición intrauterina de tóxicos como PFOS en el funcionamiento testicular en diferentes etapas de la vida. Entre las ventajas de usar un modelo *in vivo* en diferentes etapas de desarrollo, se puede destacar la posibilidad de estudiar la anatomía de un individuo y relacionar parámetros morfométricos con eventos de bioquímicos como el descontrol de la esteroidogénesis o función hepática, del mismo modo, es posible estudiar la calidad de las muestras espermáticas de los individuos adultos que meses atrás fueron expuestos a estos compuestos, por último, al estudiar individuos se puede evaluar el potencial reproductivo como prueba definitiva de la capacidad reproductiva de los ratones expuestos *in útero* a diferentes tóxicos.

El SDT puede atribuirse a los siguientes cuatro aspectos clave: factores genéticos, trastornos del crecimiento intrauterino, factores de estilo de vida y exposición ambiental. Estos factores contribuyen al desarrollo anormal de los testículos en el cual la diferenciación alterada de células de Leydig y Sertoli conduce a un deterioro de la función de células germinales [1]. La contaminación ambiental provoca que los organismos vivos se encuentren expuestos a un sin número de compuestos xenobióticos, muchos de los cuales pueden tener efectos tóxicos. Particularmente, los CPF son resistentes en el ambiente debido a sus características químicas, los organismos vivos no presentan mecanismos que los degraden. Por otro lado, los mecanismos de excreción para CPF, son poco eficientes, por lo que, suelen ser bioacumulados. Su presencia ha sido demostrada en diferentes fluidos corporales, entre los que se incluyen, el fluido folicular, líquido amniótico, sangre del cordón umbilical. Aunado a esto pueden atravesar la barrera hemato-placentaria provocando una exposición de tóxicos durante la gestación [45, 46, 90, 91]]. A su vez la producción espermática promedio ha decrecido en la población mundial en las últimas seis décadas. Diferentes estudios proponen que la exposición de diferentes contaminantes durante la gestación puede afectar el desarrollo y diferenciación testicular, que conlleven a deficiencias en la calidad espermática, incrementando la probabilidad de desarrollar trastornos reproductivos y provocando infertilidad [2], [32], [39], [55]. Por lo cual es de suma importancia evaluar los efectos que puede generar la exposición a PFOS durante el desarrollo gonadal temprano y sus repercusiones sobre la reproducción de los mamíferos utilizando el ratón macho como modelo.

## **6. Pregunta de investigación.**

¿La exposición a PFOS durante el desarrollo fetal podrá causar errores en el desarrollo somático y testicular en diferentes etapas de la vida y estos podrán afectar la calidad espermática y comprometer la fertilidad?

## **7. Hipótesis.**

Diferentes efectos adversos en la fisiología celular han sido atribuidos a PFOS, por lo tanto, la exposición a este compuesto durante el desarrollo gonadal temprano puede inducir alteraciones en el desarrollo somático y gonadal, deficiencia en la calidad espermática y problemas de fertilidad.

## **8. Objetivo general.**

Tras la exposición a PFOS durante la vida fetal del ratón, evaluar los efectos en la morfometría somática y gonadal, así como la calidad espermática y la capacidad reproductiva de ratones CD-1 adultos.

### **8.1 Objetivos particulares.**

- Valorar las alteraciones en el desarrollo fetal de ratones macho que sean producidas por la exposición a PFOS durante la gestación, a través de patrones morfométricos como la talla, peso, la distancia anogenital y el índice gonadosomático en las etapas prepuberal, puberal y adulta.
- Analizar la calidad espermática del semen de ratones adultos de 90 días que fueron tratados durante la gestación.
- Estudiar la capacidad reproductiva de los ratones adultos tratados durante la gestación.

## 9. Diseño experimental

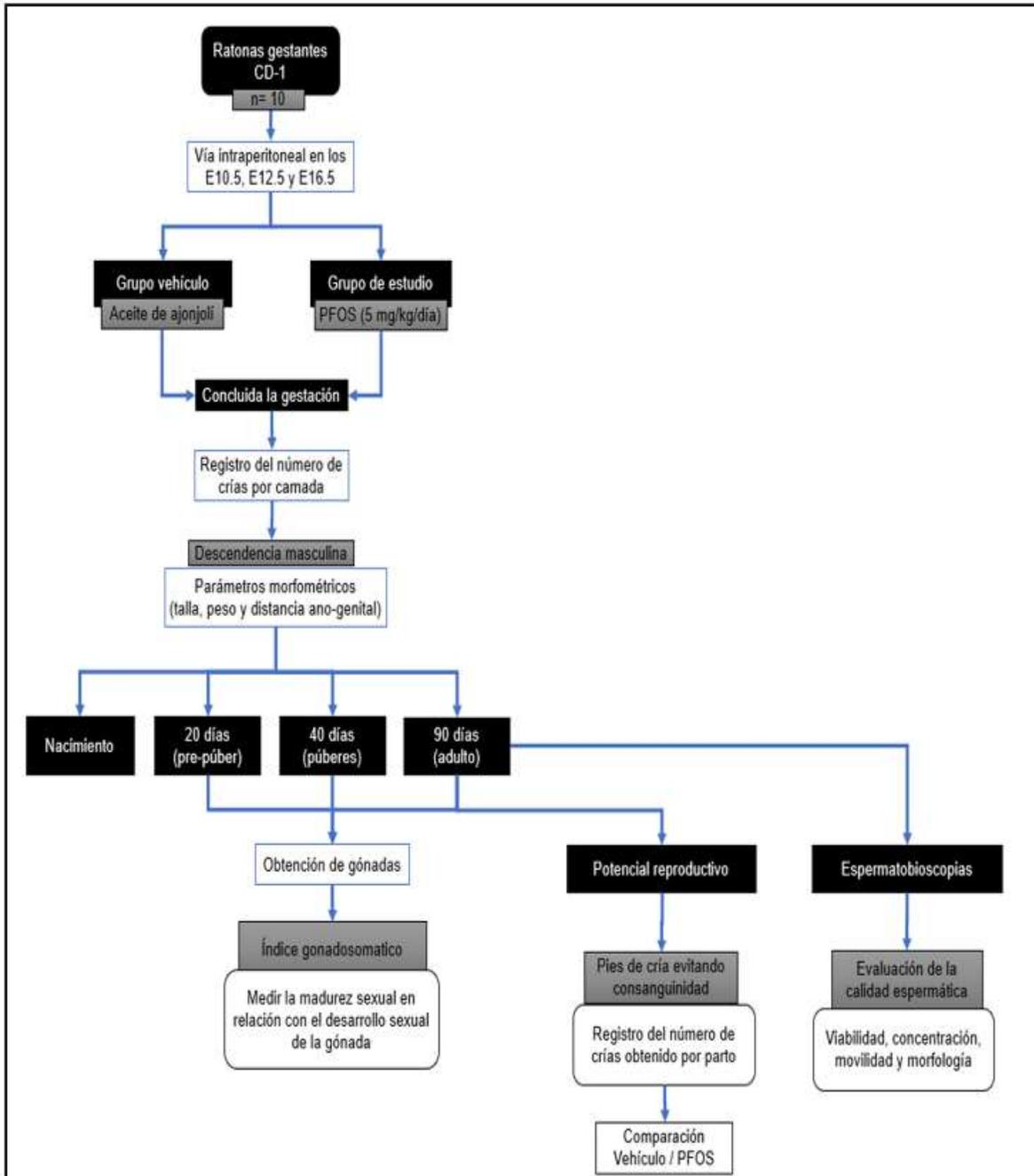


Figura 5. Diseño experimental donde se observa la administración de PFOS en ratonas gestantes, dejando concluir la gestación para evaluar los patrones morfométricos (talla, peso, DAG, índice gonadosomático), en ratones al nacimiento, 20, 40 y 90 días, así como, la calidad espermática y el potencial reproductivo en ratones adultos (90 días).

## **10. Metodología**

### *10.1 Animales de experimentación.*

Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 cuya colonia fue mantenida en el bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. La manipulación de los animales fue realizada de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 062 ZOO 1999 y con aprobación del comité de ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

### *10.2 Reactivos y compuestos:*

El sulfonato de perfluorooctano (335-76-2) y el vehículo de dilución (aceite de ajonjolí, 8008-74-0) se compraron a Merc-Millipore (MR), fue diluido en aceite de ajonjolí para ser administrado in vivo respectivamente, bajo el esquema ya mencionado. Al grupo control se le administró únicamente aceite de ajonjolí por vía intraperitoneal.

### *10.3 Modelo experimental de exposición gestacional a PFOS.*

Para realizar los tratamientos durante la gestación, se utilizaron hembras gestantes CD-1. Se separaron en dos grupos (5 ratonas gestantes por grupo), grupo vehículo (aceite de ajonjolí), grupo PFOS (5 mg/kg/día) [92, 93, 94]. Se les administró a las hembras gestantes en los estadios de 10.5, 12.5 y 16.5 días post coito por vía intraperitoneal utilizando jeringas con agujas de 8 milímetros.

#### 10.4 Valoración de patrones morfométricos de ratones macho, expuestos durante la gestación

A los ratones macho tratados en la vida intrauterina, las alteraciones en el desarrollo fueron valoradas a través de patrones morfométricos como la talla, el peso y la distancia anogenital. Se midieron a los ratones desde la cabeza a la parte inicial de la cola en estado de reposo. Para la obtención de los datos del peso se utilizó una balanza de precisión con sensibilidad 0.01 g. La distancia anogenital se midió desde la papila genital hasta la apertura anal. Todos los datos se registraron cada semana desde el nacimiento hasta los 90 días.

#### 10.5 Obtención de testículos para valorar el índice gonadosomático

De cada camada fueron sacrificados entre dos y tres organismos en tres diferentes tiempos de vida: 20 días después del nacimiento (prepúberes), 40 días después del nacimiento (púber) y 90 días después del nacimiento (adulto) (n=10 por grupo), en estos animales, se extrajeron ambos testículos y se determinó el peso de todos para su posterior análisis.

#### 10.6 Evaluación de la calidad espermática

Se evaluó la calidad espermática con base en los parámetros de la OMS y Bergmann, 2010 [95, 96], contemplando lo siguiente: concentración, viabilidad, normalidad, movilidad, aglutinación y agregación. Estos parámetros fueron analizados en muestras de semen provenientes de la cola de los epidídimos, dado que en este se encuentra una mayor concentración espermática y una buena movilidad.

Se obtuvo el semen de 5 machos adultos de 90 días de edad por cada grupo. La concentración y el porcentaje de espermatozoides anormales se analizó por muestra de semen obtenido de la cola de los epidídimos, los cuales se colocaron en una caja de Petri con 5 ml de solución de *buffer* fosfato salino (PBS) durante 30 minutos a 37.5 C°. Con pinzas se realizó el corte del epidídimo para facilitar la dispersión, se utilizó la cámara de Neubauer siguiendo el procedimiento recomendado por la OMS, se evaluó la muestra ya homogenizada y se hizo el conteo. La cantidad de espermatozoides por

macho se expresó en millones/ mililitro. La morfología se evaluó en muestras de 10 $\mu$  de semen extendidas en un portaobjetos, se tiñeron con eosina B y se examinaron bajo microscopio óptico a 1000 aumentos. Se analizaron 200 espermatozoides por macho tomando los criterios de clasificación para la morfología espermática, siendo estos: A normales, B con defecto de cabeza y C con defecto de flagelo [95, 96]. Los espermatozoides que presentaron cabeza triangular, globular o en martillo se identificaron como defecto de cabeza y los que tenían defecto de flagelo fueron los que presentaban curvatura a nivel de la pieza intermedia, cola rectilínea o con curvatura tanto en la porción media como distal.

Del semen obtenido se tomó una muestra de 10  $\mu$ L de semen y 10  $\mu$ L de eosina B para teñir los espermatozoides muertos, se homogenizó la muestra y se colocó en un portaobjetos para observar a un objetivo a 40 aumentos, se realizó un conteo de 200 espermatozoides en diferentes campos.

Se clasificaron como:

Espermatozoides vivos (no teñidos)

Espermatozoides muertos (teñidos)

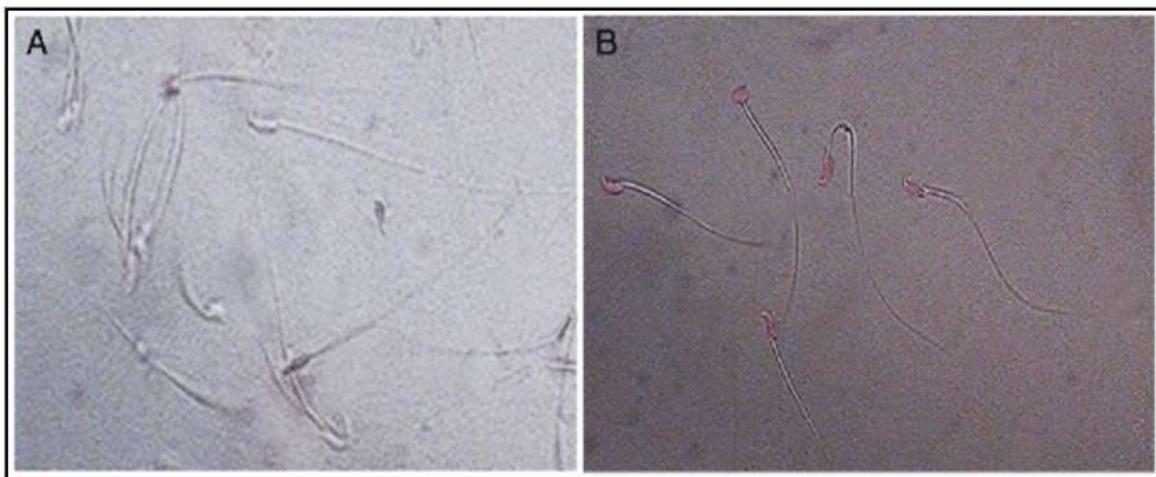


Figura 6. Tinción con eosina b de espermatozoides de ratón, (A) Espermatozoides sin teñir (vivos) y (B) Espermatozoides teñidos de rosa (muertos).

La movilidad de los espermatozoides se evaluó a partir de muestras de semen de 10 ratones adultos de ambos grupos, se colocó una muestra de 10 $\mu$ L en un portaobjetos observándose a un objetivo a 40 aumentos y se realizó un conteo de 200 espermatozoides en diferentes campos, contados en dirección a las manecillas del reloj.

Se clasificaron en porcentajes de las siguientes categorías:

- A. Movilidad progresiva: espermatozoides que se mueven activamente, tanto linealmente como en un gran círculo, independientemente de la velocidad.
- B. Movilidad no progresiva: cualquier otro patrón de movilidad en ausencia de progresión.
- C. Inmóviles: espermatozoides que no presentan ningún movimiento.

La movilidad total se expresó en porcentaje, y es la suma de la movilidad A más la movilidad B.

### 10.7 Evaluación del potencial de fertilización de los ratones CD-1 expuestos a PFOS durante la vida fetal.

Para evaluar si la exposición a CPF durante el desarrollo embrionario afecta la fertilidad, se establecieron pies de cría evitando consanguinidad y se cuantificó el número de crías obtenido por parto de ratonas expuestas a PFOS durante el desarrollo embrionario y se comparó con las crías obtenidas de ratones control.

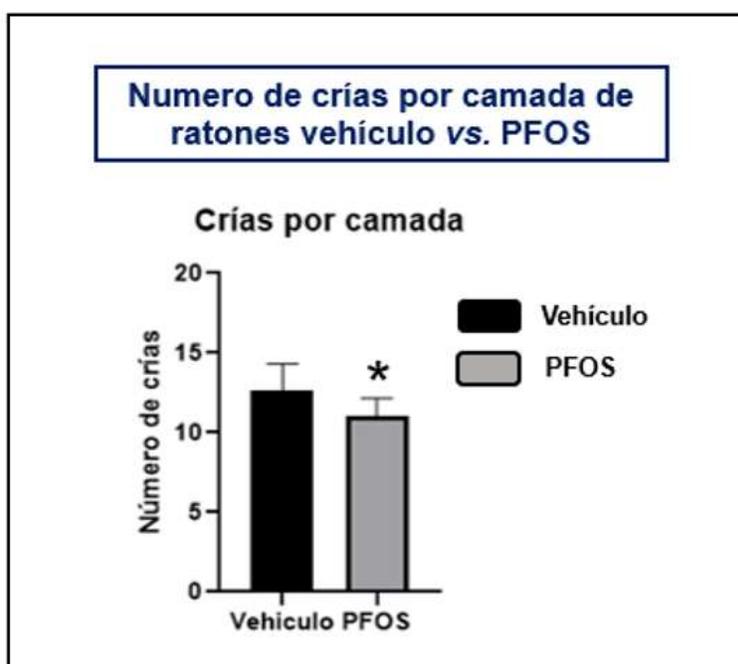
### 10.8 Análisis de imágenes y paquetes estadísticos.

Para la evaluación cuantitativa de cada uno de los parámetros (número de crías por camada, talla, peso, distancia anogenital e índice gonadosomático) se realizó un análisis estadístico de comparación de dos grupos independientes, t- Student. En cuanto a los parámetros de la calidad espermática (viabilidad, concentración, movilidad y morfología) se realizó un análisis estadístico de comparación de dos grupos independientes, U de Mann-Whitney. Cada experimento donde se evaluaron los parámetros morfométricos, se realizaron 10 repeticiones por grupo, con un nivel de confianza de  $p < 0.05$ . Para la evaluación de la calidad espermática se realizaron 5 repeticiones por grupo, con un nivel de confianza  $p < 0.05$ .

## 11. RESULTADOS

### Evaluación del efecto de PFOS administrado a los días 10.5, 12.5 y 16.5 dpc en el número de crías por camada de ratones CD-1.

Para evaluar el posible efecto de PFOS en la capacidad reproductiva se registró y cuantificó el número de crías por camada de los grupos vehículo y PFOS. En la gráfica 1 se observa que existe una disminución en el número de crías en ratonas gestantes expuestas a PFOS (barra negra) en los días 10.5, 12.5 y 16.5 dpc con respecto al grupo control (barra gris).

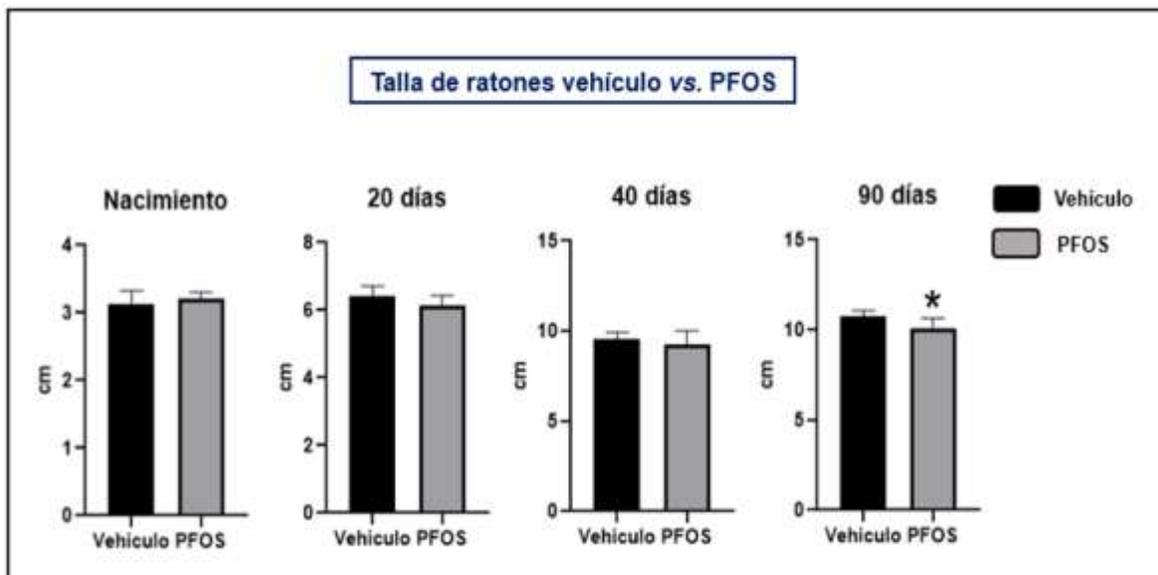


**Gráfica 1. Número de crías por camada de ratones vehículo y PFOS.** Las barras indican la media  $\pm$  DE,  $n= 10$  por grupo. El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el grupo vehículo contra el grupo PFOS. t- Student ( $p < 0.05$ ).

La exposición a PFOS durante la gestación puede relacionarse con la disminución del número de crías por camada en comparación con el grupo vehículo.

### Efecto del PFOS sobre los parámetros morfométricos (talla, peso y DAG)

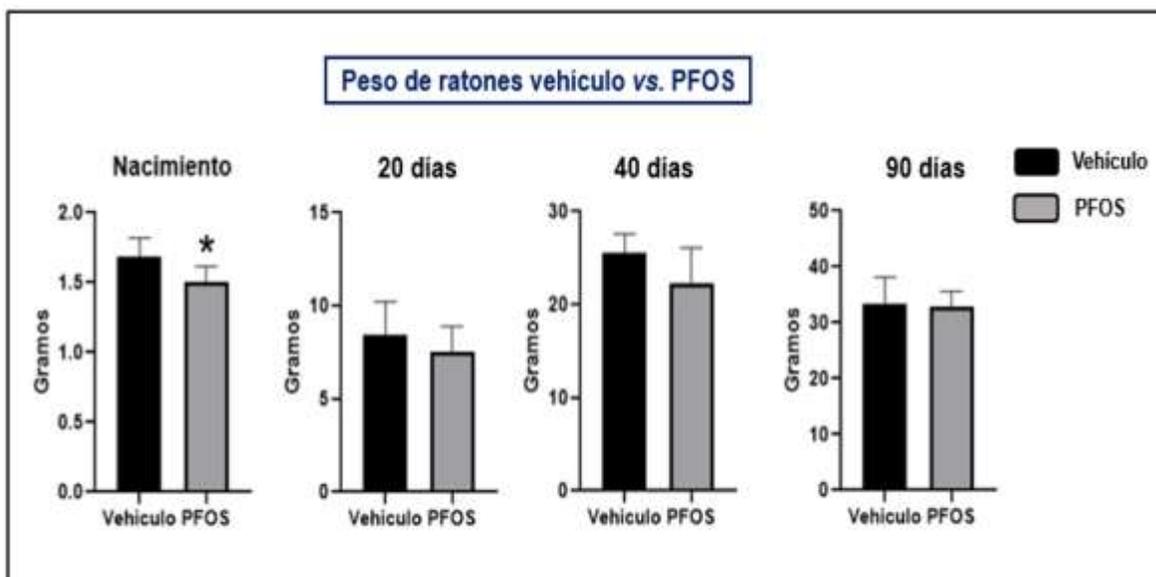
Se empleó una dosis de 5 mg/kg/día de PFOS para administrar a cada ratona gestante en los días E.10.5, E12.5 y E16.5. En la gráfica 2 se muestra la talla de los ratones registrada al nacimiento, 20 y 40 días, al comparar ambos grupos la prueba estadística de t-Student no muestra diferencias significativas. Sin embargo, al día 90 existe diferencia significativa donde los ratones presentan una menor talla en comparación con el grupo vehículo .



**Gráfica 2. Talla de ratones vehículo vs. PFOS (Nacimiento, 20, 40 y 90 días).** Las barras indican la media DE, n= 10 por grupo por día. El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el grupo PFOS contra el grupo vehículo. t- Student ( $p < 0.05$ ).

Lo cual indica que la exposición a PFOS durante la gestación afecta la talla en ratones adultos (90 días de edad). Mientras que, en ratones neonatos, pre-púber y púberes esta exposición no interfiere con la talla.

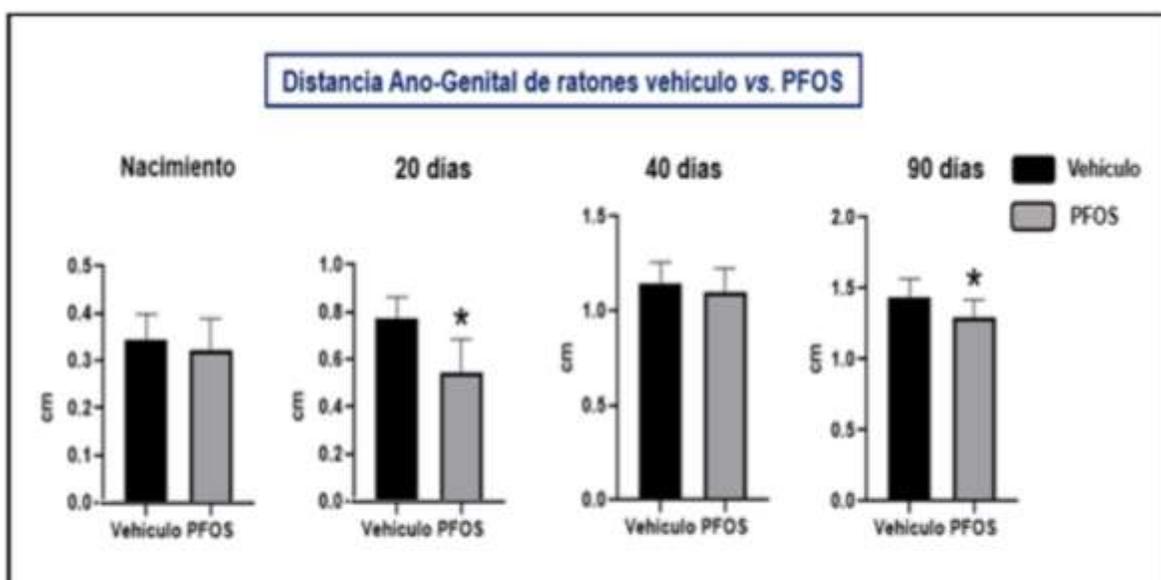
El peso registrado al nacimiento, 20, 40 y 90 días, en ambos grupos, se muestra en la gráfica 3. Se observa menor peso en ratones tratados con PFOS durante la gestación, estadísticamente significativo, en comparación con el grupo vehículo. No obstante, a los 20, 40 y 90 días, no se presentó diferencia significativa).



**Gráfica 3. Peso de los ratones vehículo y PFOS (Nacimiento, 20, 40 y 90 días).** Las barras indican la media  $\pm$  DE, n= 10 por grupo por día. El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el grupo vehículo contra el grupo PFOS. t- Student ( $p < 0.05$ ).

El peso fue menor en ratones neonatos CD-1, tras una exposición gestacional a PFOS, indicando que el tratamiento pudo retrasar el desarrollo fetal, a pesar de que las camadas son menores y eso debería favorecer el incremento en peso y talla de los nacidos. En ratones prepúberes, púberes y adultos el peso no se ve afectado por la exposición a PFOS, indicando que la ausencia del tratamiento durante el desarrollo postnatal puede compensar la ganancia de talla y mostrando un posible efecto reversible.

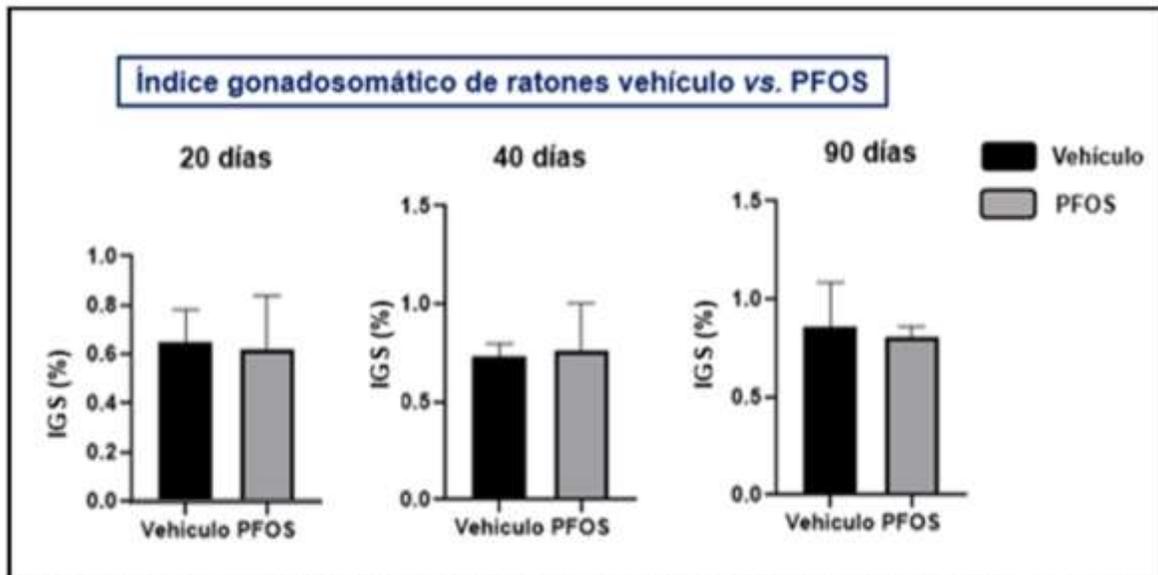
En la gráfica 4, se encontró una menor distancia anogenital a los días 20 y 90 esta fue, estadísticamente significativa en el grupo PFOS en comparación con el grupo vehículo. Sin embargo, no existe diferencia al nacimiento ni a los 40 días, si bien la distancia anogenital al nacimiento es pequeña y los métodos utilizados podrían no tener la sensibilidad para detectar un cambio, mientras que, a los cuarenta días, la diferencia no es significativa y es probable que en una mayor muestra de individuos logre observar una diferencia significativa.



**Grafica 4. Distancia Ano-Genital de ratones vehículo y PFOS (Nacimiento, 20, 40 y 90 días).** Las barras indican la media  $\pm$  DE,  $n= 10$  por grupo por día. El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el grupo vehículo contra el grupo PFOS. t- Student ( $p < 0.05$ ).

### Efecto de la exposición de PFOS en el índice gonadosomático

Se obtuvo el índice gonadosomático de ratones macho prepúberes, púberes y adultos; ya que este valor puede ayudar a estimar defectos en el crecimiento y diferenciación evidenciando si existe el hipogonadismo. Sin embargo, en este estudio no se registró diferencia significativa del grupo PFOS con respecto al grupo control.

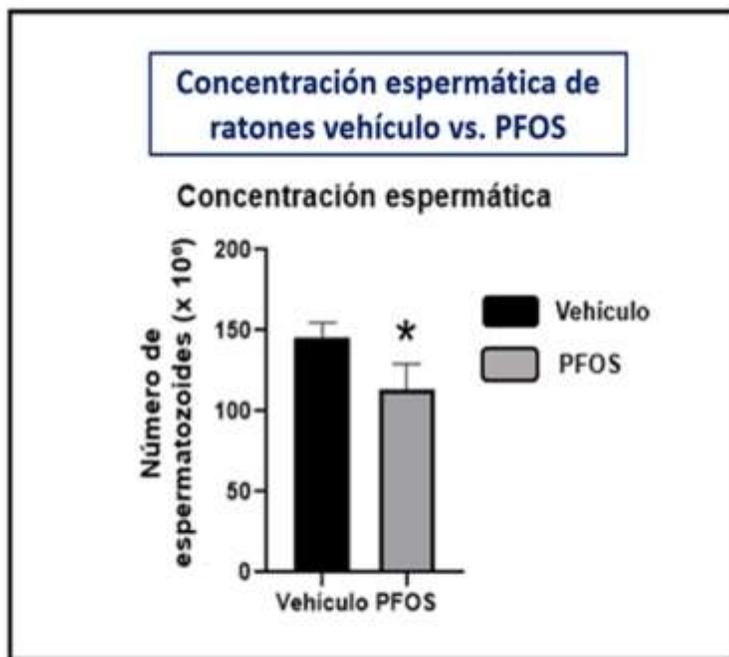


**Gráfica 5. Evaluación del índice gonadosomático.** No existe diferencia significativa en cuestión del peso testicular con respecto al peso total del ratón. Se utilizó la prueba estadística t- Student con una diferencia significativa (\* $p < 0.05$ ).

La exposición a PFOS durante la gestación no afecta el índice gonadosomático del ratón macho CD-1 en ninguno de los días registrados.

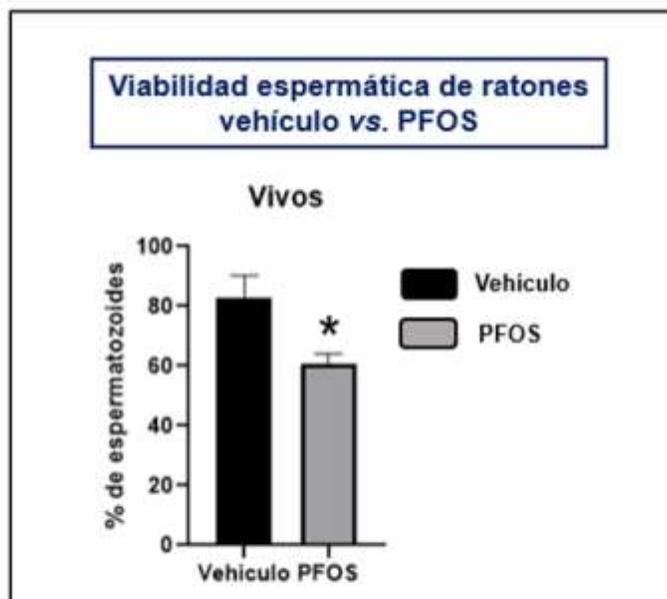
### Efecto del PFOS en la concentración espermática

Para evaluar si los defectos en la calidad espermática fueron cuantitativos, se determinó la concentración espermática en ambos grupos, el grupo PFOS mostró una disminución significativa con respecto al grupo control, como se muestra en la gráfica 6., Estos resultados podrían indicar que los errores en la calidad espermática tal vez están relacionados con defectos en la diferenciación temprana de las gónadas, lo cual está relacionado con el momento en el que se da el estímulo agresor.



**Gráfica 6.** Concentración de espermatozoides (células x 10<sup>6</sup>) obtenidos de la región caudal epididimaria de ratones vehículo y PFOS (90 días). Las barras indican la media ± DE, n=6 por grupo. El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se compararon ambos grupos, utilizando U de Mann Whitney.

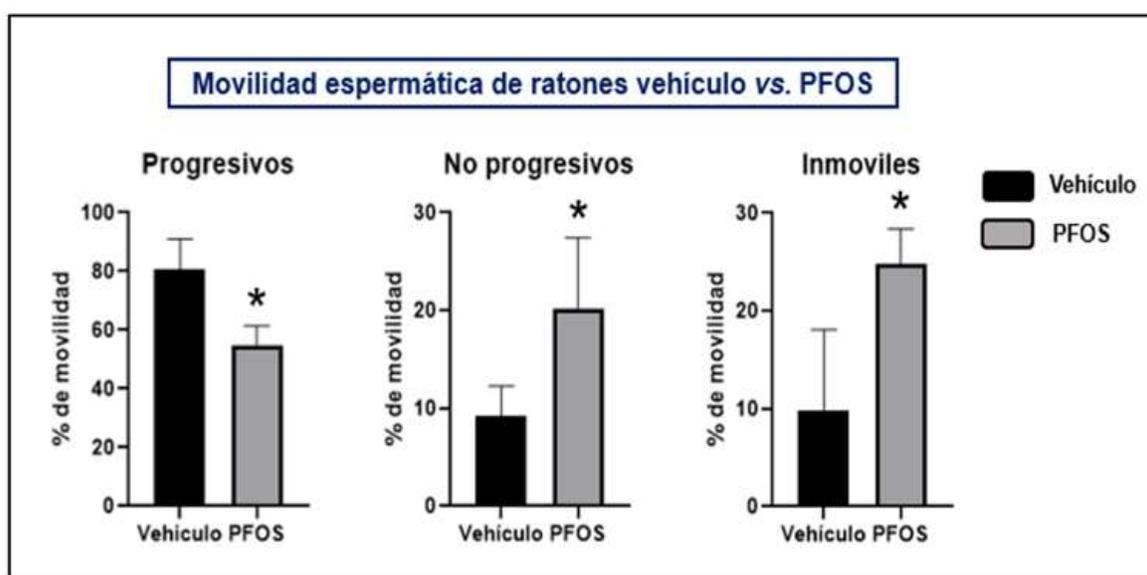
La grafica 7 muestra la viabilidad de los espermatozoides de ratones adultos (90 días) expuestos a PFOS durante la gestación, donde se indica un menor porcentaje de espermatozoides vivos en el grupo PFOS (60.91%) en comparación con el grupo vehículo (82.58%). La exposición a PFOS administrado a los 10.5, 12.5 y 16.5 dpc sí alteró la viabilidad espermática en los ratones macho adultos (90 días). Se analizó la viabilidad espermática en 6 ratones (por grupo).



**Grafica 7. Porcentaje de la viabilidad espermática de ratones vehículo y PFOS (90 días).** Las barras indican la media  $\pm$  DE, n=6 por grupo. El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se compararon ambos grupos, utilizando U de Mann Whitney.

Lo anterior indica que se disminuye el porcentaje de espermatozoides vivos en ratones adultos de 90 días de edad, tras una exposición gestacional a PFOS.

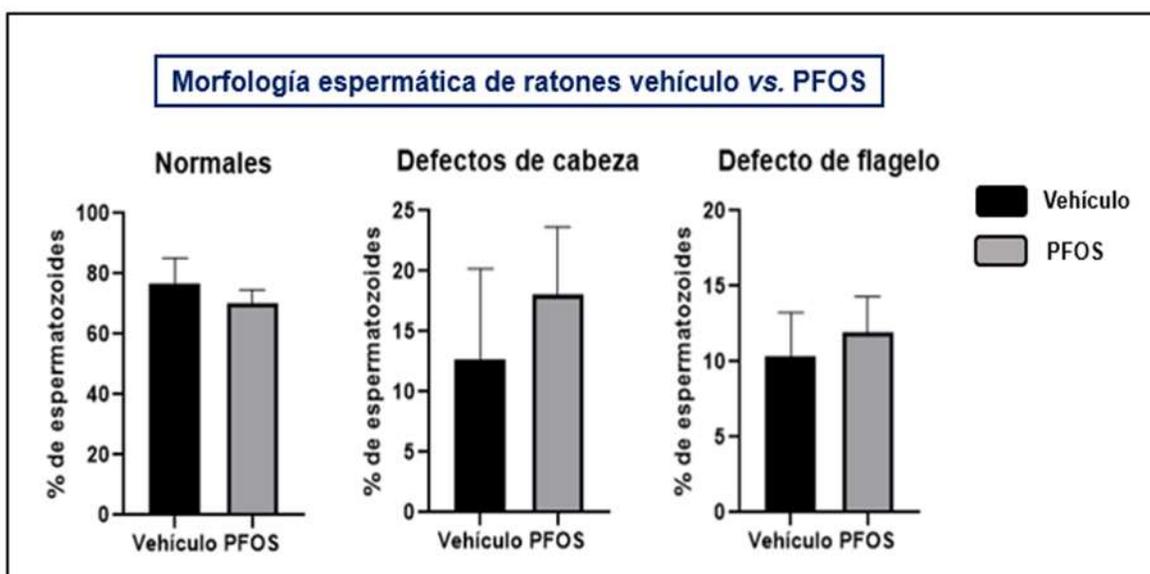
El PFOS afectó los tres parámetros de la movilidad espermática (progresivos, no progresivos e inmóviles), se muestran en la gráfica 8. Disminuyó el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva (54.93%), aumentando así el porcentaje de espermatozoides no progresivos (20.24%) e inmóviles (24.82%) en comparación con el grupo vehículo (80.88%, 9.20% y 9.8% respectivamente) demostrando que los insultos químicos durante el desarrollo fetal pueden estar relacionados con los defectos en la calidad espermática (Gráfica 8).



**Gráfica 8. Porcentaje de la movilidad espermática de ratones vehículo y PFOS (90 días) donde se evaluó tres parámetros: progresivos, no progresivos e inmóviles.** Las barras indican la media  $\pm$  DE, n=6 por grupo. El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) cuando se compararon ambos grupos, utilizando U de Mann Whitney.

Estos resultados demuestran que una exposición gestacional a PFOS puede causar alteraciones en la movilidad espermática en ratones adultos (90 días de edad) de la cepa CD-1. Disminuyendo el porcentaje de espermatozoides progresivos y aumentando el porcentaje de espermatozoides no progresivos e inmóviles en ratones macho expuestos a PFOS durante la gestación, lo cual podría relacionarse con el menor número de crías por camada.

No existe diferencia significativa entre los parámetros morfológicos de los espermatozoides en la edad adulta, entre los grupos expuestos a PFOS durante la gestación en comparación con el grupo control al no haber diferencia entre los defectos de la cabeza o flagelo, como se observa en la gráfica 9.

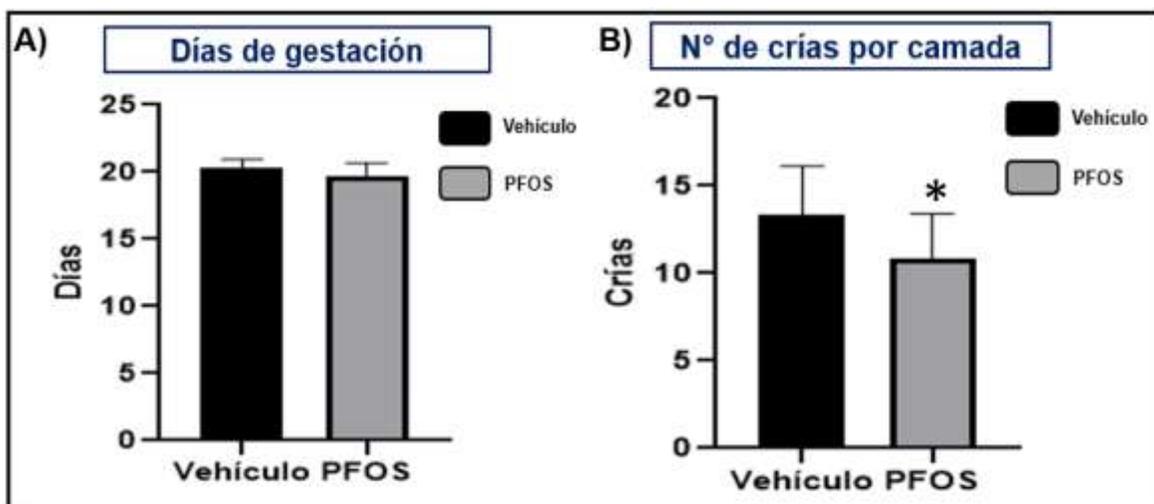


Gráfica 9. Porcentaje de la morfología espermática de ratones vehículo y PFOS (90 días). Con tres parámetros: Normales, con defecto de cabeza y con defecto de flagelo. Las barras indican la media  $\pm$  DE, n= 6 por grupo. t- Student ( $p < 0.05$ ).

Estos datos indican que la concentración de la forma espermática puede no estar afectada por la exposición gestacional a PFOS en ratones adultos de 90 días de edad.

Evaluación del potencial de fertilización de los ratones CD-1 expuestos a PFOS durante la vida fetal.

Los días de gestación de ratonas CD-1 sin tratamiento, puestas a copular con ratones macho expuestos a PFOS durante la gestación, no se vieron afectados, como se observa en la gráfica A, cómo ocurre cuando la exposición se da durante toda la gestación y utilizando dosis altas [85]. Sin embargo, en la gráfica B, el número de crías obtenido si disminuye, demostrando que algunos de fetos no culminaron el desarrollo, esto podría ser explicado por los defectos en la calidad espermática, generando así, una subfertilidad en ratones expuestos a PFOS durante la gestación.



Gráfica 10. Evaluación del potencial de fertilización de los ratones CD-1 expuestos a PFOS durante la vida fetal puestas a copula con ratonas CD-1 sin tratamiento. La gráfica A) indica la duración de la gestación (días) y la gráfica B) el Número de crías por camada. Las barras indican la media ± DE, n= 10 por grupo. El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el grupo vehículo contra el grupo PFOS. t- Student (p < 0,05).

El número de crías por camada de las ratonas CD-1 sin tratamiento se vio disminuido en el grupo PFOS en comparación con el grupo vehículo. Lo cual indica que los machos expuestos a PFOS durante la gestación y puestos a cópular, pueden tener alteraciones en la calidad espermática en cuanto a la viabilidad, concentración y movilidad. .

## 12. Discusión

En este estudio, se demostró que la exposición a PFOS in vivo, administrando una dosis (5 mg/kg/día) en los estadios 10.5, 12.5 y 16.5 durante la gestación en ratonas, puede alterar patrones morfométricos en la descendencia masculina como la talla, peso y la distancia anogenital. Así mismo, en ratones de 90 días se altera la viabilidad, movilidad y concentración espermática y aunque no afecta el potencia de fertilización, se encontró una disminución en el número de crías, que puede ser explicada por la afectación en la calidad espermática.

Para conocer cuáles son los efectos que puede inducir PFOS administrado durante la gestación, se evaluaron parámetros morfométricos que permitieron evaluar el desarrollo sexual y morfológico del organismo en diferentes etapas del organismo.

Se puede observar que la exposición a PFOS durante la gestación disminuye la talla en ratones de 90 días (adultos), mientras que el peso en esta misma etapa es similar al grupo control, por lo cual, se propone que PFOS pudiese estar alterando el metabolismo de lípidos. Estudios realizados en ratas y ratones, administrando PFOS durante la gestación (2 mg/kg/día y 15-20 mg/kg/día, respectivamente) indicaron un retraso en la talla, así como en el peso al nacimiento [84]. En humanos se ha encontrado una asociación entre las concentraciones más altas de PFOS evaluadas en suero materno con una disminución del peso promedio al nacimiento [48], [46], [91], [76]. Lo cual concuerda con este estudio donde el peso es menor en neonatos, PFOS podría estar actuando como un agente teratogénico alterando la talla y peso en diferentes etapas de la vida del organismo.

Se ha observado que PFOS puede causar alteraciones endocrinas y cambios en la biosíntesis de hormonas sexuales [43] [56] [57]. La DAG revela la cantidad de andrógeno a la que está expuesto un feto masculino en el desarrollo temprano y es más prolongada en comparación con las hembras, en roedores [97]. En humanos no se ha encontrado evidencia clara de que las concentraciones plasmáticas de PFOS en la madre estén asociadas con una distancia anogenital infantil más corta en hombres [98]. Actualmente no existen reportes sobre la exposición a PFOS durante la gestación y los efectos en la

DAG en roedores. En este análisis se vio un acortamiento en la DAG en ratones macho de 20 y 90 días, en comparación con el grupo control. Nuestros hallazgos sugieren una asociación entre la exposición a PFOS durante la gestación y efectos antiandrogénicos en el feto en desarrollo, que se ven reflejadas en ratones prepúberes y adultos. Aunado a esto, una DAG más corta en humanos adultos se asocia con una mala calidad del semen y con infertilidad [70] lo que podría asociarse con las alteraciones en la calidad espermática y la posible subfertilidad que se muestran en este estudio.

No se afectó el índice gonadosomático en ninguno de los días evaluados, lo cual indica que la exposición a PFOS durante la gestación, no altera el peso testicular ni el peso del organismo en etapas prepúberes, púberes y adultas. Estudios en pez cebra expuestos a perfluorononanoato (PFNA) se reporta un IGS menor en machos, lo cual se relaciona con una bioacumulación mayor de CPF en las gónadas masculinas [99]. Probablemente la vida media de PFOS en roedores y bioacumulación de PFOS en las gónadas masculinas no sea tan prolongada para reflejar alteraciones en el IGS.

Para conocer si alteraciones en los parámetros morfométricos se pueden relacionar con una disminución la calidad espermática se realizaron espermátobioscopias en ratones de 90 días (adultos). Donde los parámetros de viabilidad, concentración y movilidad se vieron disminuidos en ratones expuestos a PFOS durante la gestación, en comparación con el grupo vehículo. Lo cual es similar en estudios realizados en ratas y ratones expuestos a PFOS en etapas adultas afectando la concentración y conteo de espermatozoides normales [55], [56], [62], [67]. En humanos se relacionan niveles más altos de PFOS con una disminución en la concentración y recuento de espermatozoides normales. Se podría proponer una subfertilidad que puede atribuirse a daños en el ADN espermático.

Investigaciones realizadas en ratones indican que la exposición al ácido perfluorooctanoico (PFOA) durante la gestación (E1-E17) causa toxicidad en desarrollo que incluye un aumento de embriones reabsorbidos, disminución de la supervivencia fetal y retraso del crecimiento fetal [101]. Estudios en roedores y conejos expuestos a PFOS durante toda la gestación, observaron una asociación en abortos espontáneos y reabsorciones fetales [84]. En este trabajo si bien, no se evaluó la reabsorción fetal, se

observa que disminuyen las crías por camada en ratonas gestantes expuestas a PFOS en tres estadios de la gestación, lo cual sugiere que PFOS podría estar induciendo los mismos efectos de dosis crónicas y altas.

En roedores se ha reportado que la exposición a CPF (en neonatos hasta el destete y en ratones adultos) en diferentes dosis (10, 15 y 20 mg/kg/día) y posteriormente puestos a cópula, tienen un menor potencial de fertilización.[85]. En este trabajo se puede observar un menor número de crías por camada y alteraciones en la calidad espermática, lo cual podría indicar una subfertilidad causada por la exposición a PFOS durante la gestación y un daño en el espermatozoide (daño al ADN) o reabsorción fetal.. Estudios posteriores, podrían proponer los mecanismos celulares y/o moleculares que conllevan a las afectaciones en la espermatogénesis y la subfertilidad producidas por la exposición a PFOS

### **13. Conclusiones**

En ratones macho la exposición durante la gestación a PFOS altera la talla en adultos, disminuye el peso en ratones al nacimiento y acorta la DAG en prepuberes y adultos por lo cual proponemos que la exposición a PFOS durante la gestación y la concentración utilizada, puede tener un efecto teratogénico y sus efectos se ven reflejados en diferentes etapas de la vida del organismo. Por otro lado, el acortamiento de la distancia anogenital y los defectos en la calidad espermática reflejan un estado de hipoandrogenismo que podrían ser demostrados por un estudio posterior. En conjunto, los efectos teratogénicos y/o el hiperandronenismo producidos por la exposición a PFOS traen como consecuencia una subfertilidad, que corresponde con los errores en la calidad espermática.

## **14. Perspectivas**

- En muestras de suero de hembras gestantes expuestas a PFOS y ratones expuestos a PFOS durante la gestación, determinar el balance de andrógenos (Testosterona/Estradiol/progesterona) mediante la prueba de ELISA.
  
- En cortes histológicos de testículo evaluar la morfología celular germinal y somática por medio de tinción hematoxilina-eosina. Así como, la evaluación de expresión de marcadores de diferenciación de células germinales y somáticas por medio de inmunohistoquímica.
  
- En lisado de tejidos testiculares, analizar la expresión de marcadores de diferenciación de CG y somáticas, por medio de metilación específica mediante PCR (MSP).

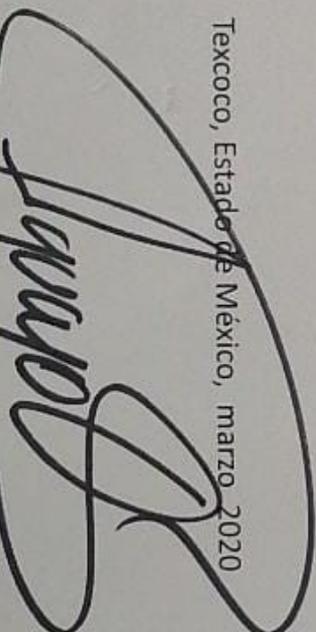
El Gobierno del Estado de México, a través de la Secretaría de Cultura  
otorga el presente

# RECONOCIMIENTO a

**Luisa González**

Por la excelente presentación de la conferencia  
***Trastornos reproductivos masculinos***  
Llevada a cabo en el Marco del Día Internacional de la Mujer  
del Centro Cultural Mexiquense Bicentenario

Texcoco, Estado de México, marzo 2020



**Arqlda. Estibaliz Aguayo Ortiz**  
Coordinadora de Aceptivo Cultural del CCMB

## 15. Bibliografía

1. Xing, J.-S., y Bai, Z.-M. (2018). Is testicular dysgenesis syndrome a genetic, endocrine, or environmental disease, or an unexplained reproductive disorder? *Life Sciences*, 194, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.039>
2. Gaona, R., Salazar, C., Hernández, M. y García, G. (2013). Manejo del varón infértil. De Endocrinología reproductiva e infertilidad. México, PRADO, 1° edición; 371.
3. Van den Driesche, S., Kilcoyne, K. R., Wagner, I., Rebourcet, D., Boyle, A., Mitchell, R. y Sharpe, R. M. (2017). Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. *JCI Insight*, 2(6), e91204. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91204>
4. Grinspon, R. P., Gottlieb, S., Bedecarrás, P., y Rey, R. A. (2018). Anti-Müllerian Hormone and Testicular Function in Prepubertal Boys With Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00182>
5. Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., y Nieschlag, E. (2010). Physiology of Testicular Function. *Andrology*, 11-59. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8_2)
6. Yön, Nazan Deniz y Akbulut, Cansu. (2015) Identificación de células germinales primordiales: aspectos citológicos, histológicos e inmunohistoquímicos. *Archivos Brasileños de Biología y Tecnología*, 58 (2), 222-228. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201500335>
7. Wear, H. M., McPike, M. J. y Watanabe, K. H. (2016). De las células germinales primordiales a los folículos primordiales: revisión y representación visual del desarrollo ovárico temprano en ratones. *J Ovarian Res*, 9, pág. 36
8. Lanner, F. (2014). Especificación de linaje en el embrión de ratón temprano. *Exp Cell Res*, 321, págs. 32 - 39
9. Sun, J., Ting, M. C., Ishii, M. y Maxson, R. (2016). Msx1 y Msx2 funcionan juntos en la regulación de la migración de células germinales primordiales en el ratón. *Dev Biol*, 417, pp. 11 - 24

10. Tam, P. y Snow, M. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal Embryology Experimental Morphology*, 64: 133-47
11. Yildirim, E., Aksoy, S., Onel, T. y Yaba. (2020). Gonadal development and sex determination in mouse. *Reproductive Biology*, 20(2), 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.01.007>
12. Western, P. S., Miles, D. C., van den Bergen, J. A., Burton, M. y Sinclair, A. H. (2008). Regulación dinámica de la detención mitótica en células germinales masculinas fetales. *Stem Cells*, 26, págs. 339 - 347
13. Nagano, R., Tabata, S., Nakanishi, Y., Ohsako, S., Kurohmaru, M. y Hayashi, Y. (2000). Reproliferación y reubicación de células germinales masculinas de ratón (gonocitos) durante la prespermatogénesis. *Anat Rec*, 258, págs. 210 - 220
14. Yaba, A., Ordueri, N. E., Tanriover, G., Sahin, P., Demir, N. y Celik-Ozenci, C. (2015). Expresión de CCM2 y CCM3 durante la gonadogénesis de ratón. *J Assist Reprod Genet*, 32, págs. 1497 - 1507
15. Smith, L. B. y Walker, W. H. (2014). La regulación de la espermatogénesis por andrógenos. *Semin Cell Dev Biol*, 30, págs. 2 - 13
16. Allais-Bonnet, A. y Pailhoux, E. (2014). Papel de la familia de proteínas priónicas en las gónadas. *Front Cell Dev Biol*, 2, pág. 56
17. Teerds, K., Veldhuizen-Tsoerkan, M., Rommerts, F., de Rooij, D., Dorrington, J. (1994). Proliferación y diferenciación de células intersticiales testiculares: aspectos del desarrollo de células de Leydig en los testículos (pre) pubertal y adulto. En: Verhoeven G., Habenicht UF. (eds) *Endocrinología molecular y celular de los testículos*. Taller de la Fundación de Investigación Ernst Schering, vol 1. Springer, Berlín, Heidelberg
18. Lejeune, H., Habert, R. y Saez, M. (1998). Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 20: 1-25.
19. Sriraman, V., Anbalagan, M., y Rao, A. J. (2005). Hormonal regulation of Leydig cell proliferation and differentiation in rodent testis: A dynamic interplay between

- gonadotrophins and testicular factors. *Reproductive Biomedicine Online*, 11(4), 507-518. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61147-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61147-9)
20. Chen, H., Wang, Y., Ge, R., y Zirkin, B. R. (2017). Leydig Cell Stem Cells: Identification, Proliferation and Differentiation. *Molecular and cellular endocrinology*, 445, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.010>
21. Wu, X., Wan, S., y Lee, M. M. (2007). Key factors in the regulation of fetal and postnatal leydig cell development. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 429-433. <https://doi.org/10.1002/jcp.21231>
22. Figueiredo, A., França, L., Hess, R., y Costa, G. (2016). Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats. *Cell Cycle*, 15(18), 2486-2496. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1207835>
23. Sharpe, R., McKinnell, C., Kivlin, C., y Fisher, J. (2003). Proliferación y maduración funcional de células de Sertoli, y su relevancia para los trastornos de la función testicular en la edad adulta. *Reproducción*, 125: 769-784.
24. Dolci, S., Campolo, F., y De Felici, M. (2015). Gonadal development and germ cell tumors in mouse and humans. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 45, 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.002>
25. Brennan, J. y Capel, B. (2004). Un tejido, dos destinos: eventos genéticos moleculares que subyacen al desarrollo de los testículos versus el ovario. *Nat Rev Genet*, 5, págs. 509 – 521
26. Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P. y Lovell-Badge, R. (1995). Expresión de Sry, el gen que determina el sexo del ratón. *Development*, 121, págs. 1603 – 1614
27. Jost, A., Vigier, B., Prepin, J. y Perchellet, J. P. (1973). Estudios sobre diferenciación sexual en mamíferos. *Recent Prog Horm Res*, 29, pp. 1 – 41.
28. Orvis, G. D. y Behringer, R. R. (2007). Mecanismos celulares de formación de conductos de Muller en el ratón. *Dev Biol*, 306, págs. 493 – 504.

29. Barsoum, I. y Yao, H. H. (2006). El camino hacia la masculinidad: de los testículos al conducto de Wolff. *Trends Endocrinol Metab*, 17, págs. 223 – 228
30. Staack, A., Donjacour, A. A., Brody, J., Cunha, G. R. y Carroll, P. (2003). Desarrollo urogenital del ratón: un enfoque práctico. *Diferenciación*, 71, págs. 402 – 413
31. Giesy, J., y Kannan, K. (2001). Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ Sci Technol* 35, 1339-42.
32. Olsen, G. W., Butenhoff, J. L., y Zobel, L. R. (2009). Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: An epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.), 27(3-4), 212-230. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.02.001>
33. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (2009). Resumen de salud pública perfluoroalquilos. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaq.html> (Consultada en octubre de 2019).
34. DRAFT Indicator for Third Edition of America's Children and the Environment. (2011). Consultada en octubre de 2019. Disponible en: [www.epa.gov/ace/ace3drafts/](http://www.epa.gov/ace/ace3drafts/)
35. Castells, V., Vicente, E., Gómez, J., Llobet, J., Perelló, G. y Domingo, J. (2012). Contaminantes químicos. Estudio de dieta total en Cataluña 2008. Agencia de Salud Pública de Cataluña y Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. Disponible en: <http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir1593/doc34191.html>
36. UNEP (2006). Informe del Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes sobre la labor realizada en su segunda reunión. Perfil de riesgos del sulfonato de perfluorooctano. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
37. Ng, C. A., y Hungerbühler, K. (2014). Bioaccumulation of Perfluorinated Alkyl Acids: Observations and Models. *Environmental Science & Technology*, 48(9), 4637-4648. <https://doi.org/10.1021/es404008g>
38. Kummu, M., Sieppi, E., Koponen, J., Laatio, L., Vähäkangas, K., Kiviranta, H. y Myllynen, P. (2015). Organic anion transporter 4 (OAT 4) modifies placental

- transfer of perfluorinated alkyl acids PFOS and PFOA in human placental ex vivo perfusion system. *Placenta*, 36(10), 1185-1191. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.07.119>
39. Wu, X. M., Bennett, D. H., Calafat, A. M., Kato, K., Strynar, M., Andersen, E. y Hertz-Picciotto, I. (2015). Serum concentrations of perfluorinated compounds (PFC) among selected populations of children and adults in California. *Environmental Research*, 136, 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.09>.
40. Berg, V., Nøst, T. H., Huber, S., Rylander, C., Hansen, S., Veyhe, A. S., Fuskevåg, O. M., Odland, J. Ø., & Sandanger, T. M. (2014). Maternal serum concentrations of per- and polyfluoroalkyl substances and their predictors in years with reduced production and use. *Environment International*, 69, 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.04>.
41. Mitro, S. D., Johnson, T., & Zota, A. R. (2015). Cumulative Chemical Exposures During Pregnancy and Early Development. *Current environmental health reports*, 2(4), 367-378. <https://doi.org/10.1007/s40572-015-0064-x>
42. Austin, M. E., Kasturi, B. S., Barber, M., Kannan, K., MohanKumar, P. S., y MohanKumar, S. M. J. (2003). Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environmental Health Perspectives*, 111(12), 1485-1489. <https://doi.org/10.1289/ehp.6128>
43. Zeng, X.-W., Qian, Z., Emo, B., Vaughn, M., Bao, J., Qin, X.-D., y Dong, G.-H. (2015). Association of polyfluoroalkyl chemical exposure with serum lipids in children. *Science of The Total Environment*, 512-513, 364-370. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.042>
44. Blum, A., Balan, S. A., Scheringer, M., Trier, X., Goldenman, G., Cousins, I. T. y Weber, R. (2015). The Madrid Statement on Poly- and Perfluoroalkyl Substances (PFASs). *Environ Health Perspect*, 123(5), A107-111. doi: 10.1289/ehp.1509934
45. von Ehrensteina, O., Fentonb, S., Kayoko, K., Kuklenyikc, Z., Calafat A. y Hinesb, E. (2009). Polyfluoroalkyl chemicals in the serum and milk of

- breastfeeding women. *Reprod Toxicol.* 27(3-4):239-45. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.03.001.
46. Whitworth, K., Haug, L., Baird, D., Becher, G., Hoppin, J., Skjaerven, R., Thomsen, C., Eggesbo, M., Travlos, G., Wilson, R., y Longnecker, M. (2012). Perfluorinated compounds and subfecundity in pregnant women. *Epidemiology.* 23(2): 257– 263. doi: 10.1097/EDE.0b013e31823b5031
47. CESE (2006). Dictamen del Comité Ético y Social Europeo sobre la Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las restricciones, a la comercialización y el uso de sulfonatos de perfluorooctano. Comité Ético y Social Europeo.
48. Olsen, G. W., Butenhoff, J. L., y Zobel, L. R. (2009). Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: An epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.), 27(3-4), 212-230. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.02.001>
49. Emmett, E. A., Shofer, F. S., Zhang, H., Freeman, D., Desai, C., y Shaw, L. M. (2006). Community Exposure to Perfluorooctanoate: Relationships Between Serum Concentrations and Exposure Sources. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine*, 48(8), 759-770. <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000232486.07658.74>
50. Kato, K., Wong, L.-Y., Jia, L. T., Kuklennyik, Z., y Calafat, A. M. (2011). Trends in exposure to polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. Population: 1999-2008. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 8037-8045. <https://doi.org/10.1021/es1043613>
51. Olsen, G. W., Ellefson, M. E., Mair, D. C., Church, T. R., Goldberg, C. L., Herron, R. M., y Zobel, L. R. (2011). Analysis of a homologous series of perfluorocarboxylates from American Red Cross adult blood donors, 2000-2001 and 2006. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 8022-8029. <https://doi.org/10.1021/es1043535>

52. Calafat, A. M., Wong, L.-Y., Kuklenyik, Z., Reidy, J. A., y Needham, L. L. (2007). Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. population: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004 and comparisons with NHANES 1999-2000. *Environmental Health Perspectives*, 115(11), 1596-1602. <https://doi.org/10.1289/ehp.10598>
53. Fu, J., Gao, Y., Cui, L., Wang, T., Liang, Y., Qu, G. y Jiang, G. (2016). Occurrence, temporal trends, and half-lives of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in occupational workers in China. *Scientific Reports*, 6, 38039. <https://doi.org/10.1038/srep38039>
54. Pereiro, N. y Lafuente, A. (2012). Toxicología del sulfonato de perfluorooctano (PFOS) como modelo de compuesto orgánico fluorado. *Revista de Toxicología*, 29 (2), 107-116.
55. Steves, A. N., Turry, A., Gill, B., Clarkson-Townsend, D., Bradner, J. M., y Bachli, I. (2018). Per- and polyfluoroalkyl substances impact human spermatogenesis in a stem-cell-derived model. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 64(4), 225-239. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1481465>
56. Guruge, K. S., Taniyasu, S., Yamashita, N., Wijeratna, S., Mohotti, K. M., Seneviratne, H. R. y Miyazaki, S. (2005). Perfluorinated organic compounds in human blood serum and seminal plasma: A study of urban and rural tea worker populations in Sri Lanka. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 7(4), 371-377. <https://doi.org/10.1039/b412532k>
57. Sonthithai, P., Suriyo, T., Thiantanawat, A., Watcharasit, P., Ruchirawat, M., y Satayavivad, J. (2016) Perfluorinated chemicals, PFOS and PFOA, enhance the estrogenic effects of 17beta-estradiol in T47D human breast cancer cells. *J Appl Toxicol.* 36(6): p. 790-801
58. Fei, C., McLaughlin, J. K., Tarone, R. E., y Olsen, J. (2007). Perfluorinated chemicals and fetal growth: A study within the Danish National Birth Cohort. *Environmental Health Perspectives*, 115(11), 1677-1682. <https://doi.org/10.1289/ehp.10506>

59. Chen, T. Zhang, L, Yue, J-q., Xia, W., Wan, Y-Y., Li, Y-y. y Xu, S-q. (2012). Prenatal PFOS exposure induces oxidative stress and apoptosis in the lung of rat off-spring. *Reproductive Toxicology*, 33: 538-545.
60. Yang B, Zou W, Hu Z, Liu F, Zhou L, Yang S, Kuang H, Wu L, Wei J, Wan J, Zou T, y Zhang D. (2014). Involvement of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Injury Caused by Perfluorooctanoic Acid Exposure in Mice. *BioMed Research International*. Article ID 409837
61. Domínguez, A., Salazar, Z., Arenas, E., Betancourt, M., Ducolomb, Y., González-Márquez, H., Casas, E., Teteltila, M., & Bonilla, E. (2016). Effect of perfluorooctane sulfonate on viability, maturation and gap junctional intercellular communication of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 35, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.05.011>
62. Raymer, J. H., Michael, L. C., Studabaker, W. B., Olsen, G. W., Sloan, C. S., Wilcosky, T., y Walmer, D. K. (2012). Concentrations of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoate (PFOA) and Their Associations with Human Semen Quality Measurements. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.y.), 33(4), 419-427. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.05.024>
63. Chaparro-Ortega, A., Betancourt, M., Rosas, P., Vázquez-Cuevas, F. G., Chavira, R., Bonilla, E., Casas, E., y Ducolomb, Y. (2018). Endocrine disruptor effect of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) on porcine ovarian cell steroidogenesis. *Toxicology in Vitro*, 46, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.09.030>
64. Zhao Z, Xie Z, Möller A, Sturm R, Tang J, Zhang G. y Ebinghaus R. (2012). Distribution and long-range transport of polyfluoroalkyl substances in the Arctic, Atlantic Ocean, and Antarctic coast. *Environmental Pollution*. 170: 71-77
65. Qu, K., Song, J., Zhu, Y., Liu, Y., y Zhao, C. (2018). Perfluorinated compounds binding to estrogen receptor of different species: A molecular dynamic modeling. *Journal of Molecular Modeling*, 25(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3878-2>

66. Lemos, H., Dorado, J., Hidalgo, M., Gaivão, I., y Martins-Bessa, A. (2020). Assessment of dog testis perfusion by colour and pulsed-Doppler ultrasonography and correlation with sperm oxidative DNA damage. *Topics in Companion Animal Medicine*, 100452. <https://doi.org/10.1016/j.tcam.2020.100452>
67. Gonzalez-Marin, C., Gosálvez, J., y Roy, R. (2012). Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *International journal of molecular sciences*, 13, 14026-14052. <https://doi.org/10.3390/ijms131114026>
68. Lyche, J. L. (2011). Reproductive and Developmental Toxicology. Chapter 48 Phthalates. En R. C. Gupta, Ed., 637-655. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10048-7>
69. Mira-Escolano, M. P., Mendiola, J., Mínguez-Alarcón, L., Melgarejo, M., Cutillas-Tolín, A., Roca, M., López-Espín, J. J., Noguera-Velasco, J. A., y Torres-Cantero, A. M. (2014). Longer anogenital distance is associated with higher testosterone levels in women: A cross-sectional study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 121(11), 1359-1364. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12627>
70. Sheinberg, R., Siegel, E. L., Keidar, R., Mandel, D., Lubetzky, R., Kohn, E., Livneh, A., Tovbin, J., Betser, M., Moskovich, M., Marom, R., Ovental, A., Daniel, S., Factor-Litvak, P., Berkovitch, M., y Levy, A. (2020). Associations between intrauterine exposure to polychlorinated biphenyls on neonatal ano-genital distance. *Reproductive Toxicology*, 96, 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.06.005>
71. Weiss, B. (2006). Anogenital Distance: Defining "Normal". *Environmental Health Perspectives*, 114(7), A399.
72. Mondal, D., Lopez-Espinosa, M.-J., Armstrong, B., Stein, C. R., y Fletcher, T. (2012). Relationships of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate serum concentrations between mother-child pairs in a population with

- perfluorooctanoate exposure from drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 120(5), 752-757. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104538>
73. Chang, E. T., Adami, H.-O., Boffetta, P., Cole, P., Starr, T. B., y Mandel, J. S. (2014). A critical review of perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate exposure and cancer risk in humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 44(sup1), 1-81. <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.905767>
74. Klaunig J. E., Hocevar B. A. y Kamendulis LM. (2012). Mode of action analysis of perfluorooctanoic acid (PFOA) tumorigenicity and human relevance. *Reprod Toxicol*, 33, 410–8
75. Vested A, Høst C, Frodi S, Peter J, Lund S, Ingi T, Becher G, Småstuen L, Hagen E. y Toft G. (2013). Associations of in Utero Exposure to Perfluorinated Alkyl Acids with Human Semen Quality and Reproductive Hormones in Adult Men. *Environ Health Perspect*. 121(4):453-8. doi: 10.1289/ehp.1205118.
76. Fei C, McLaughlin J, Tarone R. y Olsen J. (2008). Fetal Growth Indicators and Perfluorinated Chemicals: A Study in the Danish National Birth Cohort. *Am J Epidemiol*. 168(1):66-72.
77. Jacquet N, Maire M, Landkocz Y. y Vasseur P. (2012). Carcinogenic potency of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Arch Toxicol* 86:305–314
78. Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., y Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. [Review]. *ToxicolSci*, 99(2), 366-394.
79. Lau, C., Butenhoff, J. L., y Rogers, J. M. (2004). The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicol Appl Pharmacol* 198, 231-41.
80. Luebker, D. J., Case, M. T., York, R. G., Moore, J. A., Hansen, K. J., y Butenhoff, J. L. (2005a). Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats. *Toxicology* 215, 126-48.
81. Thibodeaux, J. R., Hanson, R. G., Rogers, J. M., Grey, B. E., Barbee, B. D., Richards, J. H., Butenhoff, J. L., Stevenson, L. A., y Lau, C. (2003). Exposure

- to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations. *Toxicol Sci* 74, 369-81.
82. Stahl, T., D. Mattern, y Brunn, H. (2011). Toxicology of perfluorinated compounds. *Environmental Sciences Europe*. 23(1): p. 38.
83. Bergmann M. y Kliesch S. (2010) Biopsia testicular e histología. En: Nieschlag E., Behre HM, Nieschlag S. (eds) *Andrología*. Springer, Berlín, Heidelberg.
84. Case, M. T., York, R. G., & Christian, M. S. (2001). Rat and rabbit oral developmental toxicology studies with two perfluorinated compounds. *International Journal of Toxicology*, 20(2), 101-109.  
<https://doi.org/10.1080/10915810151115236>
85. Joensen, U. N., Veyrand, B., Antignac, J.-P., Blomberg Jensen, M., Petersen, J. H., Marchand, P. y Jørgensen, N. (2013). PFOS (perfluorooctanesulfonate) in serum is negatively associated with testosterone levels, but not with semen quality, in healthy men. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(3), 599-608.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/des425>
86. Koustas E., Lam J., Sutton P., Johnson P., Atchley D., Sen S., Robinson K., Axelrad D. y Woodruff T. (2014). The Navigation Guide Evidence Based Medicine Meets Environmental Health: Systematic Review of Nonhuman Evidence for PFOA Effects on Fetal Growth. *Environ Health Perspect*. 122(10): 1015–1027
87. Lau, C., Butenhoff, J. L., y Rogers, J. M. (2004). The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicol Appl Pharmacol* 198, 231-41.
88. Luebker, D. J., Case, M. T., York, R. G., Moore, J. A., Hansen, K. J., y Butenhoff, J. L. (2005a). Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats. *Toxicology* 215, 126-48.
89. Thibodeaux, J. R., Hanson, R. G., Rogers, J. M., Grey, B. E., Barbee, B. D., Richards, J. H., Butenhoff, J. L., Stevenson, L. A., y Lau, C. (2003). Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations. *Toxicol Sci* 74, 369-81.

90. Lau, C., Thibodeaux, J. R., Hanson, R.G., Rogers J. M., Gray, B. E., y Stanton M. E. (2003). Exposición al sulfonato de perfluorooctano durante el embarazo en ratas y ratones. II Evaluación postnatal. *Toxicol Sci*74: 382-39212773772.
91. Inoue, K., Okada, F., Ito, R., Kato, S., Sasaki, S., Nakajima, S. y Nakazawa, H. (2004). Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Related Perfluorinated Compounds in Human Maternal and Cord Blood Samples: Assessment of PFOS Exposure in a Susceptible Population during Pregnancy. *Environmental Health Perspectives*, 112(11), 1204-1207. <https://doi.org/10.1289/ehp.6864>
92. Luebker, D. J., Case, M. T., York, R. G., Moore, J. A., Hansen, K. J., y Butenhoff, J. L. (2005a). Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats. *Toxicology* 215, 126-48.
93. Thibodeaux, J. R., Hanson, R. G., Rogers, J. M., Grey, B. E., Barbee, B. D., Richards, J. H., Butenhoff, J. L., Stevenson, L. A., y Lau, C. (2003). Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations. *Toxicol Sci* 74, 369-81.
94. Stahl, T., D. Mattern, y Brunn, H. (2011). Toxicology of perfluorinated compounds. *Environmental Sciences Europe*. 23(1): p. 38.
95. Bergmann M. y Kliesch S. (2010) Biopsia testicular e histología. En: Nieschlag E., Behre HM, Nieschlag S. (eds) *Andrología*. Springer, Berlín, Heidelberg
96. World Health Organization. "WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen" Cambridge: Cambridge University. fifth Edition (2010). [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf)
97. Tian, Y., Liang, H., Miao, M., Yang, F., Ji, H., Cao, W., Liu, X., Zhang, X., Chen, A., Xiao, H., Hu, H., y Yuan, W. (2019). Maternal plasma concentrations of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances during pregnancy and anogenital distance in male infants. *Human Reproduction*, 34(7), 1356-1368. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez058>
98. Arbuckle, T. E., MacPherson, S., Foster, W. G., Sathyanarayana, S., Fisher, M., Monnier, P., Lanphear, B., Muckle, G., & Fraser, W. D. (2020). Prenatal

- perfluoroalkyl substances and newborn anogenital distance in a Canadian cohort. *Reproductive Toxicology*, 94, 31-39.  
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.03.011>
99. Du, Y., Shi, X., Yu, K., Liu, C., & Zhou, B. (2008). Chronic Effects of Waterborne PFOS Exposure on Growth, Development, Reproduction and Hepatotoxicity in Zebrafish. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry-Biological Responses to Chemical Pollutants*.
100. Jiang, W., Deng, Y., Song, Z., Xie, Y., Gong, L., Chen, Y., & Kuang, H. (2020). Gestational Perfluorooctanoic Acid Exposure Inhibits Placental Development by Dysregulation of Labyrinth Vessels and uNK Cells and Apoptosis in Mice. *Frontiers in Physiology*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00051>
101. Wolf, C. J., Fenton, S. E., Schmid, J. E., Calafat, A. M., Kuklennyik, Z., Bryant, X. A., Thibodeaux, J., Das, K. P., White, S. S., Lau, C. S., & Abbott, B. D. (2007). Developmental toxicity of perfluorooctanoic acid in the CD-1 mouse after cross-foster and restricted gestational exposures. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 95(2), 462-473.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl159>