



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

Declaración de originalidad

El que suscribe Carlos Arturo Urrutia López, alumno del posgrado en Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Evaluación de la exposición a sulfonato de perfluorooctano (PFOS) durante la etapa fetal y su relación con el desarrollo de síndrome de ovario poliquístico en ratón CD-1."

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestro en Biología de la Reproducción Animal 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 autora! 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 3 de diciembre de 2021.

Atentamente:

Carlos Arturo Urrutia López

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Maestría en Biología de la Reproducción Animal

“Evaluación de la exposición a sulfonato de perfluorooctano (PFOS) durante la etapa fetal y su relación con el desarrollo de síndrome de ovario poliquístico en ratón CD-1.”

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA:

Biol. Carlos Arturo Urrutia López

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

15 de diciembre de 2021

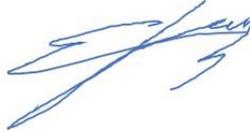
Miembros del comité de tutores

Director:

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: ivan.bahena@gmail.com



FIRMA: _____

Asesor Interno:

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: mundo@xanum.uam.mx



FIRMA: _____

Asesor Externo:

Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Correo electrónico: jreyes@inmegen.gob.mx



FIRMA: _____

Miembros del jurado de examen

DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

FIRMA:



Correo electrónico: mundo@xanum.uam.mx

DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

FIRMA:



Correo electrónico: bet@xanum.uam.mx

DR. EDUARDO CASAS HERNÁNDEZ
Departamento Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

FIRMA:



Correo electrónico: dino@xanum.uam.mx

DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental
Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza. UNAM.

FIRMA:



Correo electrónico: juserom@unam.mx

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 proyecto fue apoyado por el CONACyT, otorgando la beca a Carlos Arturo Urrutia López, con No. CVU 1012644.

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) con el número de registro 003797.

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que me acompañaron en este camino, que me brindaron su apoyo y amistad, y que creyeron en mí. Mi infinita gratitud para las siguientes personas:

Al Dr. Iván Uriel Baena Ocampo por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su dirección, por confiar y creer en mi desde un inicio y brindarme su apoyo incondicional tanto en los momentos buenos como en los momentos malos y convertirse en un gran amigo.

Al Dr. Edmundo Bonilla González por abrirme las puertas del laboratorio, el que se convirtió en mi segundo hogar, por su apoyo y críticas en este proyecto, así como por el conocimiento que me compartió.

Al Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda, por permitirme realizar parte de este proyecto en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, por sus comentarios y correcciones.

Gracias a la comisión de la MBRA y a la coordinación por el apoyo y el seguimiento a este proyecto. Gracias a los profesores que me brindaron el conocimiento necesario durante mi formación y también al CONACyT por el apoyo.

A mis queridos compañeros y amigos de laboratorio, con quien compartí tantas horas de trabajo. En especial a la Maestra Jessica Téllez, por su guía, apoyo y consejos.

A mis padres: Carlos Urrutia Vera y María Luisa López Muciño por brindarme todo el amor, confianza y paciencia. Por sostenerme en mis momentos de debilidad y flaqueza, por confiar en mi cuando nadie más lo hacía y darme el mejor ejemplo de vida. Mi infinita gratitud.

A la familia González-Carranza por ser mi segunda familia y brindarme su amistad y cariño.

A la Maestra Luisa González Carranza, por recorrer este largo camino a mi lado, por apoyarme y confiar en mí, por sostener mi mano. Gracias por ser parte de mi vida y mi familia.

Para mis padres:

*“Por ser la luz en mis momentos más
oscuros. Por su infinito amor y apoyo”*

GRACIAS

Índice

Abreviaturas	10
Resumen	12
Abstract	13
1. Introducción	14
1.1 Síndrome de ovario poliquístico (SOP).	14
1.2 Toxicología reproductiva.	15
1.3 Sulfonato de perfluorooctano.	16
1.4 El ovario y la ovogénesis.....	17
1.5 Foliculogénesis.....	18
1.6 Eje hipotálamo hipófisis ovario	20
1.7 Regulación de la esteroidogénesis ovárica	21
2. Antecedentes.....	22
3. Justificación.	24
4. Planteamiento del problema.	25
5. Pregunta de investigación.....	25
6. Hipótesis.....	26
7. Objetivo.....	26
8. Objetivos específicos.	26
9. Materiales y métodos.....	27
9.1 Animales de experimentación.	27
9.2 Reactivos y compuestos.	28
9.3 Evaluación del desarrollo a través de patrones morfométricos (peso, talla distancia anogenital).....	28
9.4 Detección de estro por citología vaginal.....	28
9.5 Determinación de los niveles séricos de hormonas esteroideas.....	28
9.6 Evaluación de la diferenciación en las gónadas de ratones CD1 expuestos a PFOS durante la gestación.....	29
9.7 Clasificación morfológica de los folículos	29
9.8 Análisis de imágenes y paquetes estadísticos	29
10. Resultados.....	31

10.1 La exposición a PFOS durante la gestación afecta los patrones morfométricos de forma diferente al modelo para SOP por hiperandrogenización con DHT. ...	31
10.1.1 Peso.....	32
10.1.2 Talla.....	33
10.1.3 índice de masa corporal.....	34
10.1.4 Peso del hígado.....	35
10.1.5 Distancia anogenital.....	36
10.2 La exposición gestacional a PFOS retarda el inicio de la etapa reproductiva y altera el ciclo estral de forma similar al modelo para SOP por hiperandrogenización con DHT.	37
10.2.1.- Apertura vaginal.....	37
10.2.2 Ciclo estral.....	38
10.2.3 Duración de las etapas del ciclo estral.....	40
10.3 Exposición gestacional a PFOS y el modelo para SOP mediante la exposición a DHT elevan los niveles séricos de testosterona en hembras adultas.....	41
10.4 La exposición gestacional a PFOS afecta el desarrollo folicular en hembras adultas de forma similar al modelo para SOP por hiperandrogenización con DHT.	42
11. Discusión.....	45
12. Conclusiones.....	54
13. Bibliografía.....	55

Abreviaturas

SOP	Síndrome de ovario poliquístico
PFOS	Sulfonato de perfluorooctano
COP	Contaminante orgánico persistente
DHT	Dihidrotestosterona
DAG	Distancia anogenital
RI	Resistencia a la insulina
IGS	Índice gonadosomático
PFOA	Ácido perfluorooctanoico
OATs	Transportadores de aniones orgánicos
LH	Hormona luteinizante
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona reguladora de gonadotropina
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
17OHPreg	17-hidroxipregnenolona
DHEA	Dehidroepiandrosterona
17-OHP	17-hidroxiprogesterona
(3B-HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
EFSA	European Food Safety Authority
17B-HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
dpc	Después del coito
IMC	Índice de masa corporal
PRH	Peso relativo del hígado
FS	Folículo secundario
AT	Antral temprano
FA	Folículo antral
CL	Cuerpo lúteo
FA	Folículo atrésico
T3	Triyodotironina

T4	Tiroxina
CREB	La proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CRTC2	Coactivador transcripcional regulado por CREB 2
AMH	Hormona antimülleriana
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero

Resumen

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es de los trastornos reproductivos más comunes, afectando de 8 % a 25 % de mujeres en edad reproductiva en todo el mundo. Los criterios de diagnóstico de Rotterdam para SOP se basan en tres principales alteraciones: problemas en la ovulación (anovulación / oligoovulación), hiperandrogenismo (clínico o bioquímico) y quistes ováricos (ovario poliquístico). La etiología de SOP es poco conocida, pero gracias al desarrollo de modelos animales (principalmente roedores) se sabe que factores genéticos y ambientales participan en el desarrollo de este padecimiento, particularmente la exposición a contaminantes ambientales durante la gestación, pudiera ser causa de SOP. El sulfonato de perfluorooctano (PFOS) es un contaminante orgánico persistente (COP) que se encuentra distribuido ampliamente en el ambiente. PFOS es ampliamente resistente a degradaciones físicas, químicas y a altas temperaturas. Se bioacumula fácilmente en diferentes órganos y tejidos, principalmente en hígado y riñón, y su vida media es de hasta 5 años en humanos. Una vez en el organismo puede atravesar fácilmente la barrera placentaria. Se sabe que PFOS puede interferir en el desarrollo y diferenciación, pero se tiene poca información sobre el papel de PFOS en el desarrollo de alteraciones reproductivas, como SOP, cuando el feto se expone durante la gestación. En este trabajo se compararon los efectos de la exposición gestacional a PFOS contra un modelo para SOP previamente establecido mediante la exposición a dihidrotestosterona (DHT), en modelos de ratón de cepa CD-1. Demostramos que la exposición gestacional a PFOS disminuye el peso, la talla y la distancia anogenital (DAG) de la descendencia; mientras que DHT los aumenta. También demostramos que PFOS retarda el inicio de la vida reproductiva, altera el ciclo estral y prolonga los diestros. En hembras adultas puede elevar los niveles de testosterona en suero y altera la morfología ovárica reduciendo el número de folículos secundarios y antrales, así como el número de cuerpos lúteos. Por esto PFOS puede estar relacionado con el desarrollo de patologías asociadas con SOP.

Abstract

Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is one of the most common reproductive, affecting 8 % to 25% of women of reproductive age worldwide. The Rotterdam diagnostic criteria for PCOS are based on three main disorders: ovulation problems (anovulation / oligoovulation), hyperandrogenism (clinical or biochemical), and ovarian cysts (polycystic ovary). The etiology of PCOS is poorly understood, but thanks to the development of animal models (mainly rodents) it is known that genetic and environmental factors participate in the development of this disease, particularly exposure to environmental pollutants during pregnancy, could be the cause of PCOS. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) is a persistent organic pollutant (POP) that is widely distributed in the environment. PFOS is broadly resistant to physical and chemical degradation and high temperatures. It easily bioaccumulates in different organs and tissues, mainly the liver and kidneys, and its half-life is up to 5 years in humans. Once in the body, it can easily cross the placental barrier. It is known that PFOS can interfere with development and differentiation, but little information is available on the role of PFOS in the development of reproductive disorders, such as PCOS, when the fetus is exposed during pregnancy. In this work, the effects of gestational exposure to PFOS were compared against a model for PCOS previously established by exposure to dihydrotestosterone (DHT), in mouse models of the CD-1 strain. We show that gestational exposure to PFOS decreases the weight, height and anogenital distance (AGD) of the offspring; while DHT increases them. We also show that PFOS slows the onset of reproductive life, alters the estrous cycle, and prolongs right-handedness. In adult females, it can raise serum testosterone levels and alter ovarian morphology, reducing the number of secondary and antral follicles, as well as the number of corpora lutea. For this reason, PFOS may be related to the development of pathologies associated with PCOS.

1. Introducción

1.1 Síndrome de ovario poliquístico (SOP).

Este síndrome es una enfermedad heterogénea en la cual se presentan alteraciones reproductivas, que a la vez, pueden ejercer una predisposición a trastornos metabólicos y otras patologías. Actualmente, a nivel mundial se estima que este síndrome se presenta de 8 % a 25% de mujeres en edad reproductiva [1], dependiendo de diferentes factores como la etnia, y la genética, entre otros. Los criterios de diagnóstico de Rotterdam para SOP se basan en tres principales alteraciones: i) problemas en la ovulación (anovulación / oligoovulación), ii) hiperandrogenismo (clínico o bioquímico) y iii) quistes ováricos (ovario poliquístico). Sin embargo, las mujeres que presentan este síndrome también presentan predisposición a muchas enfermedades y alteraciones como obesidad, resistencia a la insulina (RI) (que puede desencadenar diabetes tipo 2), enfermedades cardiovasculares, alteraciones metabólicas, hirsutismo, masculinización, entre otras. [2, 3, 4, 5].

Diferentes factores pueden atribuirse al desarrollo del SOP, entre ellos se encuentran los genéticos, ambientales y alteraciones durante el desarrollo embrionario y fetal. La etiología de SOP es poco entendida, por lo que el desarrollo de modelos animales, podría aportar información acerca de los diferentes mecanismos que originan o estimulan el desarrollo de estas alteraciones. La gran mayoría de los modelos actuales intentan cubrir dos parámetros principales: los cambios en la morfología ovárica y la síntesis de hormonas esteroides; estos modelos se desarrollan en animales adultos, que están por iniciar la etapa reproductiva, o que intervienen en el desarrollo embrionario mediante la administración de andrógenos exógenos. Los estudios relacionados con alteraciones durante la gestación se enfocan en los trastornos hormonales que presentan las madres gestantes, cómo el hiperandrogenismo, que podrían causar anomalías en el desarrollo ovárico y favorecer el desarrollo de SOP [1, 6, 7, 8, 9].

Son pocos los trabajos que evalúan la exposición gestacional a diferentes contaminantes ambientales sobre el desarrollo gonadal durante la etapa fetal y las implicaciones que podrían tener en el desarrollo de SOP en la vida reproductiva. Dentro de los contaminantes ambientales se encuentran varios que pueden actuar como disruptores endocrinos (los cuales pueden interferir con la síntesis, eliminación o acción de las hormonas), sin embargo, hay otros que no se conoce del todo sus efectos sobre la reproducción y el desarrollo, tal es el caso de los compuestos perfluorados [10].

1.2 Toxicología reproductiva.

Comprende una parte importante de la toxicología donde se abarca cualquier efecto de diversas sustancias presentes en el ambiente (ya sean medicamentos o contaminantes) sobre la reproducción de los organismos. Su estudio comprende a partir del desarrollo embrionario-fetal, cuando la exposición de la madre a estas sustancias teratogénicas puede afectar el correcto desarrollo gonadal, y tener implicaciones sobre la fertilidad durante la vida adulta. También evalúa las afectaciones en organismos neonatos, la lactancia y el rendimiento reproductivo en general. Estos estudios deben comprender los ciclos de vida completo, desde la gestación, hasta la edad adulta. Generalmente estos estudios se desarrollan en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo estos últimos los más utilizados precisamente por evaluar los efectos globales en el desarrollo y su repercusión directa o indirectamente en la reproducción, estado metabólico y energético, sistema endocrino, entre otros. Los roedores suelen ser los animales más usados por su fácil almacenamiento, manipulación, por tener varias crías por camada y ciclos de vida relativamente cortos [11, 12, 13].

Existen diferentes formas de evaluar el estado de los neonatos tanto en humanos como en animales experimentales. Por ejemplo, a través de la evaluación de parámetros en la morfología característica de cada organismo como la talla, el peso, el índice de masa corporal, la longitud de extremidades, la distancia anogenital,

parámetros cefálicos, índice gonadosomático (IGS), entre otros. Estos parámetros son ampliamente utilizados en estudios de toxicología reproductiva con el fin de evaluar en una primera instancia las afectaciones morfológicas y en el desarrollo de los neonatos [14, 15, 16].

1.3 Sulfonato de perfluorooctano.

Los compuestos perfluorados son producto de la actividad antropogénica y son ampliamente utilizados en diferentes tipos de industrias. El sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA) son los perfluorados de mayor uso en las actividades humanas, por lo que los podemos encontrar en diferentes objetos como en telas, espumas contra incendios, retardantes incendiarios, productos de cocina, sartenes antiadherentes, envoltorios de comida rápida y alimentos provenientes del mar como en pescados y mariscos. De hecho, la principal vía de exposición para los humanos es mediante la ingesta ya que estos compuestos son bioacumulables y son clasificados como contaminantes orgánicos persistentes [17, 18, 19].

Químicamente los compuestos perfluorados, se caracterizan por contener una cadena de carbono de longitud variable totalmente fluorada y con un grupo funcional terminal (carboxilato, sulfonato, sulfonamida, fosfonato o alcohol). Por estas características son persistentes y resistentes a muchos tipos de degradación, incluida la química y biológica [20]. Una vez que el PFOS ha ingresado al organismo se transporta fácilmente debido a que se comporta como ácido graso, lo que le permite unirse a la albumina, es distribuido por el torrente sanguíneo a los diferentes tejidos del cuerpo donde los transportadores de aniones orgánicos (OATs) pueden internalizar la molécula a las células [21, 22]. En este mismo sentido puede atravesar barreras fisiológicas como la hematoencefálica y la hematoplacentaria. Se sabe que PFOS se acumula principalmente en el hígado, aunque también se puede encontrar en otros órganos como riñón, corazón, gónadas, glándulas suprarrenales, sangre y bazo. El PFOS se elimina de forma lenta del organismo por

medio de la orina, su vida media en roedores es de 1 a 2 meses mientras que en humanos es de 5.3 años [22, 23].

1.4 El ovario y la ovogénesis.

En organismos sexualmente diferenciados, el sexo se determina desde la unión del ovulo con el espermatozoide, sin embargo, existe un periodo (11 días en ratón) donde las características de machos y hembras sólo pueden distinguirse a nivel genético [24, 25, 26]. Durante esta etapa indiferenciada, las futuras gónadas permanecen en estado bipotencial, es decir, pueden dar origen tanto a testículos como a ovarios. Mientras tanto, las células germinales primordiales se originan a partir de tejido extraembrionario en el saco vitelino, para migrar posteriormente hacia las crestas gonadales donde se establecerán para continuar con su división. Las células germinales primordiales, en las hembras, darán origen a las ovogonias que proliferarán por medio de mitosis sucesivas [27, 28, 29]. Algunas de las ovogonias entrarán en meiosis para formar ovocitos primarios que interaccionan con células ováricas y posteriormente darán lugar a células de la pregranulosa, esta asociación conforma entonces un folículo primordial y cuando las células de la pregranulosa aumentan en número y adoptan una forma cúbica se denomina folículo primario. Entonces las divisiones meióticas del ovocito se detienen en la etapa de diploteno antes del nacimiento y este proceso se reanudará en la pubertad con el inicio del ciclo reproductivo [30]. En la pubertad algunos ovocitos pueden reanudar la meiosis con la formación de dos células hijas de diferente tamaño: el ovocito secundario con la mayor parte del citoplasma, y el primer cuerpo polar. Posteriormente, el ovocito secundario comienza la siguiente fase de la meiosis, avanzando hasta la metafase II quedando arrestado justo antes de la ovulación. La meiosis II sólo se completa si el ovocito es fecundado; en caso contrario, la célula degenera. La ovogénesis está íntimamente relacionada con la foliculogénesis ovárica [31].

1.5 Foliculogénesis

Después de la formación del folículo primario, las células de la granulosa comienzan a proliferar en varias capas rodeadas por células de la teca, formando un folículo secundario. Hasta este momento, el desarrollo folicular es independiente de hormonas gonadotrópicas. Conforme el diámetro del folículo sigue creciendo se forma también un antro entre las células de la granulosa. Este antro está lleno de líquido folicular y, por expansión del antro y el incremento del líquido folicular, el ovocito se desplaza hacia un extremo del folículo en desarrollo, pero permanece rodeado por un grupo de células de la granulosa con las que está íntimamente relacionado, a este grupo de células se les denomina *cumulus oophorus*; en esta etapa, los folículos se denominan antrales, en este momento el desarrollo folicular es dependiente de hormonas gonadotrópicas [32, 33]

Mientras el antro comienza a aparecer, cierto grupo celular del estroma ovárico se diferencia en células de la teca, que conformarán dos capas: teca interna y teca externa. La membrana basal separa a las células de la granulosa y células de la teca interna. Durante la fase folicular, las células de la teca poseen receptores para la hormona luteinizante (LH) y las células de la granulosa poseen receptores para la hormona folículo-estimulante (FSH) [31]. En este momento, el ovario comienza a responder a los estímulos de las hormonas gonadotrópicas. FSH estimula el desarrollo de las células de la granulosa y promueve la formación de los receptores para LH en células de la teca interna. La estimulación de LH sobre las células de la teca interna inicia la síntesis de andrógenos que posteriormente serán transformados en estrógenos por aromatización en el interior de las células de la granulosa (Fig. 1) [33].

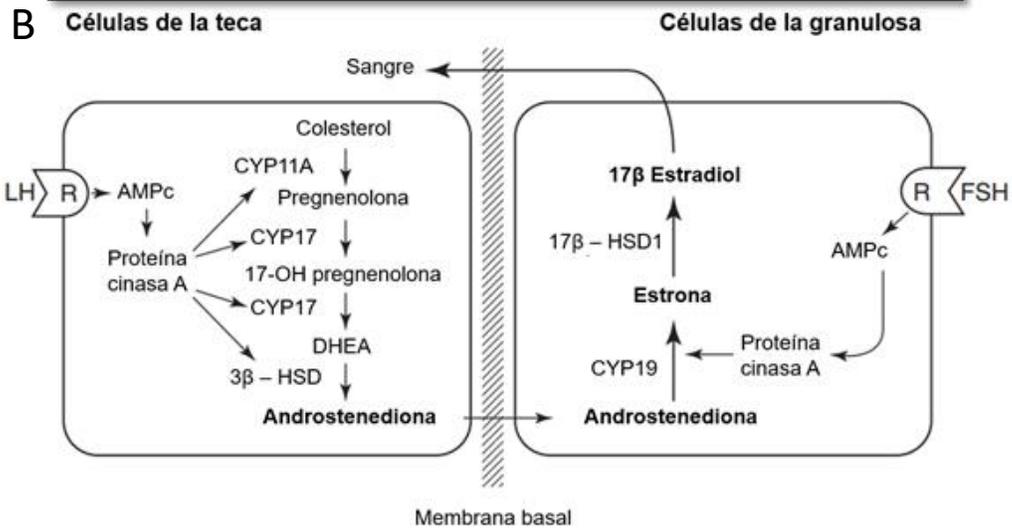
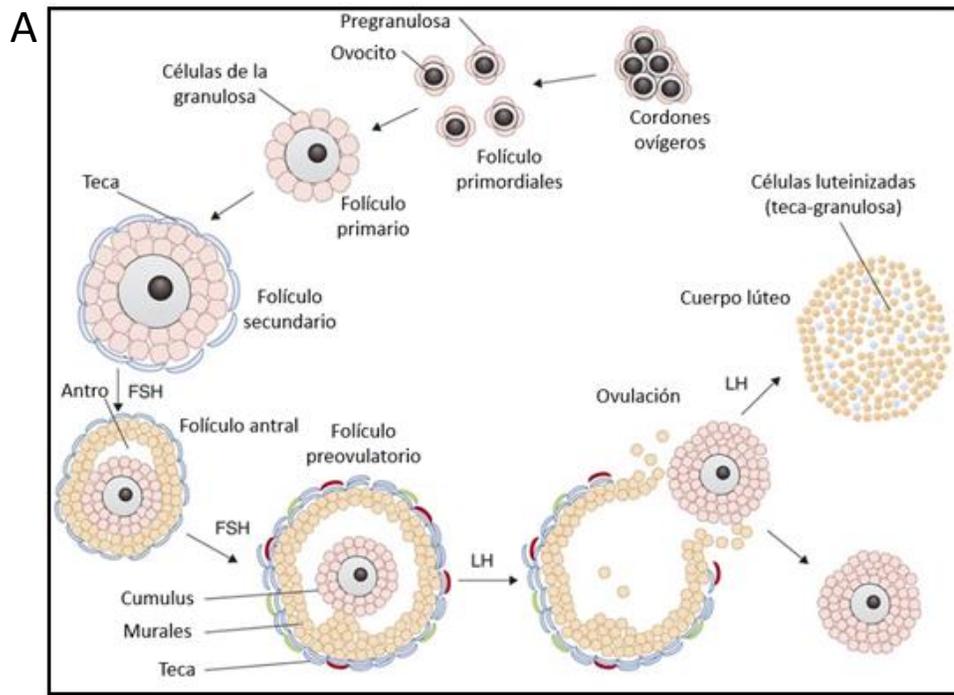


Fig.1.- Esquema del desarrollo folicular (A) y la interacción entre la célula de la teca y célula de la granulosa (B). [Modificado de: Palomba, 2018; Georges, 2014]

El incremento en la actividad pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) produce un pico preovulatorio de LH, que a su vez deriva en la ovulación. Después de la ovulación, el folículo se transforma en una estructura con células de la teca hipertrofiadas conocida como cuerpo lúteo. La función principal del cuerpo lúteo progesterona para crear una ventana de implantación en caso de que el óvulo haya sido fecundado. En ese caso, el embrión promoverá la formación de β -HCG (en humanos) para que el cuerpo lúteo continúe produciendo estrógenos y progesterona y el endometrio pueda mantenerse durante las primeras etapas del embarazo. En ausencia fecundación, no habrá producción de β -HCG por lo que las células del cuerpo lúteo entran en apoptosis y se forma una cicatriz conocida como cuerpo *albicans* [34].

Si los folículos en crecimiento no se desarrollan hasta la ovulación, entonces entrarán en un proceso conocido como atresia, que es un proceso de degeneración y reabsorción de los folículos ováricos. Los estrógenos juegan un papel importante en la atresia folicular: mientras los folículos en desarrollo aumentan el número de células de la granulosa, también aumenta la concentración de estrógenos y el número de receptores para FSH; lo cual disminuye la aromatización de andrógenos, aumentando la presencia de éstos en el antro folicular, entonces los andrógenos inducen la apoptosis en las células de la granulosa [35].

1.6 Eje hipotálamo hipófisis ovario

El inicio de la pubertad, el control de la reproducción y los ciclos reproductivos están regulados por el eje hipotalámico hipofisiario ovárico. En el hipotálamo se encuentran localizadas neuronas encargadas de la síntesis GnRH. Esta hormona viaja a través del sistema porta hipofisiario hasta la adenohipófisis donde estimula a las células gonadotropas para producir LH y FSH. Estas hormonas son liberadas al torrente sanguíneo y actúan en el ovario regulando procesos como la foliculogénesis y ovogénesis, así como la liberación de otras hormonas como andrógenos, estrógenos e inhibinas, principalmente. La liberación de GnRH, LH y

FSH regula negativamente la retroalimentación en este eje, excepto en la ovulación, donde la retroalimentación es positiva [28]. El inicio de la pubertad depende entonces de la regulación de dichas hormonas, en conjunto con otros factores como el peso de los organismos. En hembras de ratón CD-1 el inicio de la etapa reproductiva y la activación de este eje se presenta de 24 a 28 días de edad [29].

1.7 Regulación de la esteroidogénesis ovárica

En las células de la teca externa se sintetizan andrógenos por la estimulación de LH, que proviene de la adenohipófisis. Posteriormente, estos andrógenos son transferidos a las células de la granulosa mural donde son aromatizados para formar estrógenos en respuesta al estímulo de la FSH. El inicio de esta vía tiene como sustrato el colesterol, que por acción enzimática del citocromo P450_{scc} y la proteína StAR, se transforma en pregnenolona. La pregnenolona puede seguir dos vías de conversión, una es la vía de los esteroides $\Delta 5$, en la cual, por acción del citocromo P450_{c17}, que posee actividad 17 α -hidroxilasa y 17-20 liasa, y convierte su sustrato en 17-hidroxipregnenolona (17OHPreg) y dehidroepiandrosterona (DHEA), respectivamente, y la otra es la vía de los esteroides $\Delta 4$, donde la progesterona pasa por las mismas actividades enzimáticas a 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) y androstendiona. Los pasos de los esteroides $\Delta 5$ a $\Delta 4$ son asumidos por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD). Las células de la teca ovárica bajo el estímulo de la LH segregan androstendiona y testosterona; la androstendiona es aromatizada por las células de la granulosa estimuladas por la FSH para dar lugar a las estronas; a partir de la testosterona se sintetiza estradiol [36].

El desarrollo folicular entonces es muy importante, no solo para la producción de gametos, sino también para la regulación y síntesis de hormonas esteroides. De manera natural, la atresia es el proceso que ocurre normalmente en los folículos en donde no ocurre la ovulación, pero diferentes alteraciones pueden ocasionar que una mayor cantidad de folículos se vuelvan atrésicos desarrollando quistes ováricos

y una elevada producción de andrógenos en las hembras. Justo estas características están presentes en el SOP, padecimiento donde el desarrollo folicular está alterado en diferentes grados [2].

2. Antecedentes.

Estudios previos han demostrado que, en países no industrializados, la población en general ingiere 24.2 ng/Kg/día de PFOS, mientras que, en países industrializados, los niveles llegan hasta 222.15 ng/Kg/día. Según la *European Food Safety Authority* (EFSA), la ingesta diaria mínima tolerable de PFOS es de 150 ng/Kg/día. Se ha estimado que los niveles de diferentes compuestos perfluorados en suero de personas ocupacionalmente expuestas en países industrializados van de 8826 ng / mL hasta 86,300 ng / mL [37]. Los estudios realizados en el plasma de mujeres con un trimestre de embarazo han evidenciado que la concentración de PFOS es de hasta 8.2 ng/g; mientras que las concentraciones en la placenta alcanzan hasta 1.0 ng/g (14 % con respecto a la concentración en el plasma) y en el feto de 0.2 ng/g (5 % con respecto al plasma) [38].

Estudios epidemiológicos han señalado que dentro de una cohorte de pacientes con SOP que presentaban problemas en el desarrollo folicular y alteraciones en la esteroidogénesis ovárica es posible detectar altas concentraciones de PFOS; en mujeres sanas 4.9 µg/L, mientras que en mujeres con problemas en la fertilidad 8.2 µg/L [2, 22, 38]. Esta correlación indica que la exposición a estos compuestos puede afectar la fisiología del ovario. Sumado a esto, en la descendencia de mujeres ocupacionalmente expuestas a otros perfluorados (PFOA) se han encontrado alteraciones en niveles de hormonas esteroideas, este hecho apoya la hipótesis de que los compuestos perfluorados pueden actuar como posibles disruptores endócrinos [39].

Particularmente la inducción experimental de un fenotipo semejante a alteraciones ováricas que caracterizan al SOP, han sido obtenidas en ratas, a través de la

administración crónica de disruptores endocrinos como el bisfenol A, por lo que la acción de disruptor endocrino, ha sido propuesto como factor clave en el aumento de la incidencia de esta patología [40, 41, 42].

La contaminación por compuestos perfluorados se ha relacionado con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer principalmente hígado, páncreas y testículo, el mecanismo sugerido implica la proliferación de peroxisomas [38]. Otros posibles mecanismos de inducción de la carcinogénesis es el daño al ADN [43]. Por último, en células humanas, la exposición a compuestos perfluorados ha demostrado favorecer la proliferación inducida por estrógenos como el 17-beta estradiol. Este hallazgo relaciona a estos compuestos con el desarrollo de algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama [44].

La posible potenciación de los estrógenos sugiere que podrían presentar un efecto disruptor endócrino, mismo que podría afectar el desarrollo y diferenciación del linaje germinal. En estudios *in vitro*, la exposición a compuestos perfluorados se ha asociado con la inhibición de enzimas relacionadas con esteroidogénesis (3B-HSD y 17B-HSD), así como con alteraciones en los niveles de progesterona y androstendiona [45, 46].

3. Justificación.

El SOP afecta entre el 8 % y 25 % de las mujeres en edad reproductiva. Este padecimiento presenta manifestaciones clínicas como defectos en la ovulación, infertilidad, hiperandrogenismo, además se relaciona con el desarrollo de obesidad, hiperinsulinismo e incremento en el riesgo de padecer diabetes tipo dos y enfermedades cardiovasculares. No se conoce en su totalidad la etiología de este padecimiento, sin embargo, de las características más comunes se encuentra el hiperandrogenismo clínico o bioquímico.

Diferentes modelos biológicos han sido desarrollados para representar este fenómeno, la gran mayoría de ellos, en ratas y ratones en los que es inducido hiperandrogenismo por diferentes esquemas de tratamiento, a través de los cuales los animales adquieren un fenotipo semejante al de las pacientes con SOP. Debido al efecto de disruptor endocrino de los compuestos perfluorados, es posible que la exposición de compuestos como el PFOS durante las etapas tempranas de la ovogénesis pueda dar origen a ovario poliquístico o algunas de sus manifestaciones clínicas como hiperandrogenismo, problemas de ovulación y quistes ováricos.

La asociación entre la exposición a contaminantes ambientales y el desarrollo de enfermedades podría tener un impacto económico y de salud pública significativo. Este trabajo pretende determinar el efecto de la exposición a sulfonato de perfluorooctano durante la gestación (ovogénesis temprana) y su posible relación con el desarrollo de SOP en ratones CD-1.

4. Planteamiento del problema.

Los compuestos perfluorados han sido señalados como posibles disruptores endocrinos y agentes teratógenos [47], sumado a esto, a la fecha ha sido ampliamente documentada su bioacumulación en tejidos adultos y fetales. Se ha demostrado su presencia en hígado, grasa, suero de animales de vida silvestre, en suero humano, en la leche materna y en la sangre del cordón umbilical [23, 48].

Estos datos sustentan que la exposición a perfluorados ocurre durante la gestación en diferentes organismos, este efecto podría desencadenar errores en el desarrollo o en la diferenciación celular [23]. Por lo tanto, los compuestos perfluorados podrían ser causantes del retraso en el desarrollo de los organismos en diferentes etapas de su vida y estar relacionados con el desarrollo de patologías reproductivas como SOP. Por ejemplo, a través de estudios retrospectivos han sido reportados problemas del desarrollo embrionario y malformaciones, cuando la exposición a los compuestos perfluorados ocurre en periodos críticos de la gestación [45]. Sin embargo, en la literatura no hay estudios experimentales que describan los efectos de la exposición a PFOS durante el desarrollo fetal, particularmente el periodo que comprende a la ovogénesis temprana, utilizando un modelo murino. Este trabajo analiza los efectos de este tipo de exposición, sobre el desarrollo, los ciclos reproductivos y la esteroidogénesis en la vida adulta, y compara los resultados con un modelo de SOP derivado de la hiperandrogenización gestacional.

5. Pregunta de investigación.

¿Qué alteraciones en el desarrollo, los ciclos reproductivos y la esteroidogénesis características de SOP son causadas por la exposición a PFOS durante la vida fetal en ratones hembra CD-1?

6. Hipótesis.

La exposición a sulfonato de perfluorooctano puede alterar el desarrollo e inducir alteraciones en la diferenciación gonadal, que conlleven a problemas en la calidad y la cantidad de los folículos ováricos y ciclos reproductivos, generando problemas en la ovulación, formación de quistes ováricos y desarrollo de hiperandrogenismo en el ratón CD-1.

7. Objetivo.

Determinar alteraciones en los ciclos reproductivos, la morfofisiología ovárica e hiperandrogenismo en ratones de la cepa CD-1 expuestos a PFOS durante la ovogénesis temprana.

8. Objetivos específicos.

- Estandarizar un modelo murino del SOP a través de la hiperandrogenización inducida durante la gestación (ovogénesis temprana) y comparar los efectos de la exposición a PFOS y vehículo en el mismo periodo de gestación.
- Determinar las alteraciones tras la exposición gestacional a los diferentes tratamientos evaluando patrones morfométricos como peso, talla y distancia anogenital en neonatos, prepúberes, postpúberes y adultos.
- Evaluación del ciclo estral por citología vaginal y detección de estro de la descendencia femenina expuesta a los diferentes tratamientos durante la gestación.
- Estimar los niveles séricos de testosterona, estradiol y progesterona en hembras adultas expuestas a los diferentes tratamientos.
- Evaluar alteraciones histomorfológicas en los ovarios de hembras adultas que fueron expuestas a los diferentes tratamientos.

9. Materiales y métodos

9.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 cuya colonia es mantenida en el Bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana 062 ZOO 1999 y con el comité de ética de la DCBS UAM-I.

Un fenotipo semejante al ovario poliquístico puede ser obtenido en diferentes mamíferos a través de la inducción de un hiperandrogenismo artificial en diferentes etapas de la vida [49], en el laboratorio de Biología Molecular y Toxicología de la Gametogénesis de la DCBS UAM-I, se ha estandarizado un modelo murino similar por la administración de la dihidrotestosterona (DHT) en los periodos que corresponden a la ovogénesis temprana del ratón (10.5 dpc, 12.5 dpc y 16.5 dpc) [49].

Para realizar los tratamientos durante la gestación, se utilizaron hembras de entre ocho y doce semanas de edad, que fueron sometidas a cópula con machos sexualmente expertos y la fertilización fue confirmada por la presencia del tapón vaginal. Se formaron tres diferentes grupos de hasta 5 hembras: vehículo (aceite de ajonjolí), DHT (control positivo-2.5 mg/kg/día) y PFOS (grupo experimental-5 mg/kg/día). Los tratamientos de cada grupo fueron administrados en hembras gestantes en los estadios de 10.5, 12.5 y 16.5 dpc por vía intraperitoneal utilizando jeringas con agujas de 8 milímetros. Los patrones morfométricos como la talla, peso y la distancia anogenital fueron vigilados y registrados al nacimiento, 20 (prepúberes), 40 (postpúberes), 90 (adultos) y 120 (adultos) días de edad. Las hembras fueron revisadas a partir de la segunda semana de edad para detectar el día de apertura vaginal (indicador del inicio de la etapa reproductiva en roedores) y posteriormente se les realizó frotis vaginal durante 20 días (mañana, tarde y noche) para evaluar el ciclo estral.

9.2 Reactivos y compuestos.

El sulfonato de perfluorooctano (CAS 335-76-2), la 5-alfa-dihidrotestosterona (521-18-6) y el vehículo de dilución (aceite de ajonjolí, CAS 8008-74-0) fueron comprados a Merck-Millipore (MR).

9.3 Evaluación del desarrollo a través de patrones morfométricos (peso, talla distancia anogenital)

Se seleccionaron únicamente hembras que fueron expuestas a los diferentes tratamientos durante la gestación, al nacimiento y a los 20, 40, 90 y 120 días de edad (n=10 por grupo) y se realizó la evaluación de los patrones morfométricos. El peso se determinó con ayuda de una balanza digital. La medición de talla y distancia anogenital se realizó con ayuda de un vernier.

9.4 Detección de estro por citología vaginal

Se mantuvo la vigilancia de hembras expuestas a los diferentes tratamientos para determinar el día en el que presentaron apertura vaginal. Este parámetro es indicativo del inicio de la etapa reproductiva en roedores. A partir del día de apertura vaginal se realizaron tres frotis diarios (mañana, tarde y noche) durante 20 días para evaluar la citología vaginal. Esto nos permitió determinar alteraciones en los ciclos reproductivos mediante la duración del estro, proestro, metaestro y diestro a través de la presencia de células epiteliales nucleadas, células epiteliales cornificadas y leucocitos (n=10).

9.5 Determinación de los niveles séricos de hormonas esteroideas.

Para evaluar los niveles hormonales, se utilizaron estuches comerciales de ELISA para determinar estradiol, testosterona y progesterona (CAS 501890-96, 582701-96 y 582601-96, respectivamente; CAYMAN CHEMICAL CO, Ann Arbor, EE. UU.). Para esto se colectaron muestras de sangre en adultos de 120 días de edad (n=4)

mediante punción cardiaca, las muestras de sangre se utilizaron para obtener suero sanguíneo después de la coagulación y centrifugación de las muestras.

9.6 Evaluación de la diferenciación en las gónadas de ratones CD1 expuestos a PFOS durante la gestación.

Se obtuvieron las gónadas de hembras expuestas a los diferentes tratamientos a los 120 días de edad, posteriormente se fijaron y preservaron en bloques de parafina, para realizar el análisis histológico.

Se utilizaron cortes histológicos de 10 micrómetros, éstos fueron teñidos con una tinción de Hematoxilina-Eosina para el análisis histomorfométrico, con la intención de buscar quistes ováricos y clasificar los folículos presentes.

9.7 Clasificación morfológica de los folículos

Los folículos se clasificaron según sus características morfológicas observadas. Folículos secundarios si contenían un ovocito rodeado por 2 o más capas de células de la granulosa sin la presencia de un antro visible, los folículos antrales tempranos muestran una o dos áreas pequeñas entre las células de la granulosa, los folículos antrales presentan un antro bien definido y un grupo de células de la granulosa rodeando al ovocito. Los folículos atrésicos se determinaron mediante la presencia de células de la granulosa fragmentadas o la presencia de folículos son ovocito.

9.8 Análisis de imágenes y paquetes estadísticos

Los parámetros histomorfométricos básicos se analizaron con el programa libre ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Para determinar si los datos presentan una distribución normal se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk en el paquete estadístico NCSS97. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una sola vía en el paquete estadístico NCSS97 y pruebas *post hoc* (Prueba de comparación múltiple Tukey-

Kramer, prueba de comparación múltiple Kruskal-Wallis) para datos paramétricos y no paramétricos. Para finalizar, los datos se graficaron utilizando la graficadora Prism8 Graphpad. (www.graphpad.com/). Los datos obtenidos se muestran como media \pm desviación estándar.

10. Resultados

10.1 La exposición a PFOS durante la gestación afecta los patrones morfométricos de forma diferente al modelo para SOP por hiperandrogenización con DHT.

La exposición a DHT o PFOS, cuando se administran durante etapas tempranas de la ovogénesis, afecta de forma diferente a los patrones morfométricos de las hembras. De forma general, PFOS disminuye el peso y talla de las hembras acortando también el índice de masa corporal (IMC) a los 20 y 120 días de edad. El peso del hígado no se ve afectado cuando se compara con el grupo vehículo, pero disminuye en PFOS cuando se compara con el grupo DHT. La distancia anogenital (DAG) aumenta en el grupo DHT y disminuye en PFOS, sin embargo, al nacimiento se registra una menor DAG en el grupo DHT y mayor en PFOS.

A continuación, se describirán a detalle los efectos encontrados en este estudio tras la exposición *in utero* a PFOS.

10.1.1 Peso.

El modelo para SOP mediante la exposición a DHT durante la gestación mostró aumento en el peso en comparación con el grupo vehículo, en todos los tiempos registrados excepto al nacimiento. Las hembras expuestas a PFOS durante la gestación registraron menor peso al nacimiento y 20 días de edad; mientras que a los 40 las hembras registraron mayor peso en comparación con el grupo vehículo y el grupo DHT. A los 90 y 120 días de edad, el grupo PFOS muestra diferencias significativas solamente con el grupo DHT. De forma general la exposición a dihidrotestosterona durante la gestación aumenta el peso de las hembras, sin embargo, PFOS lo disminuye (Fig. 2).

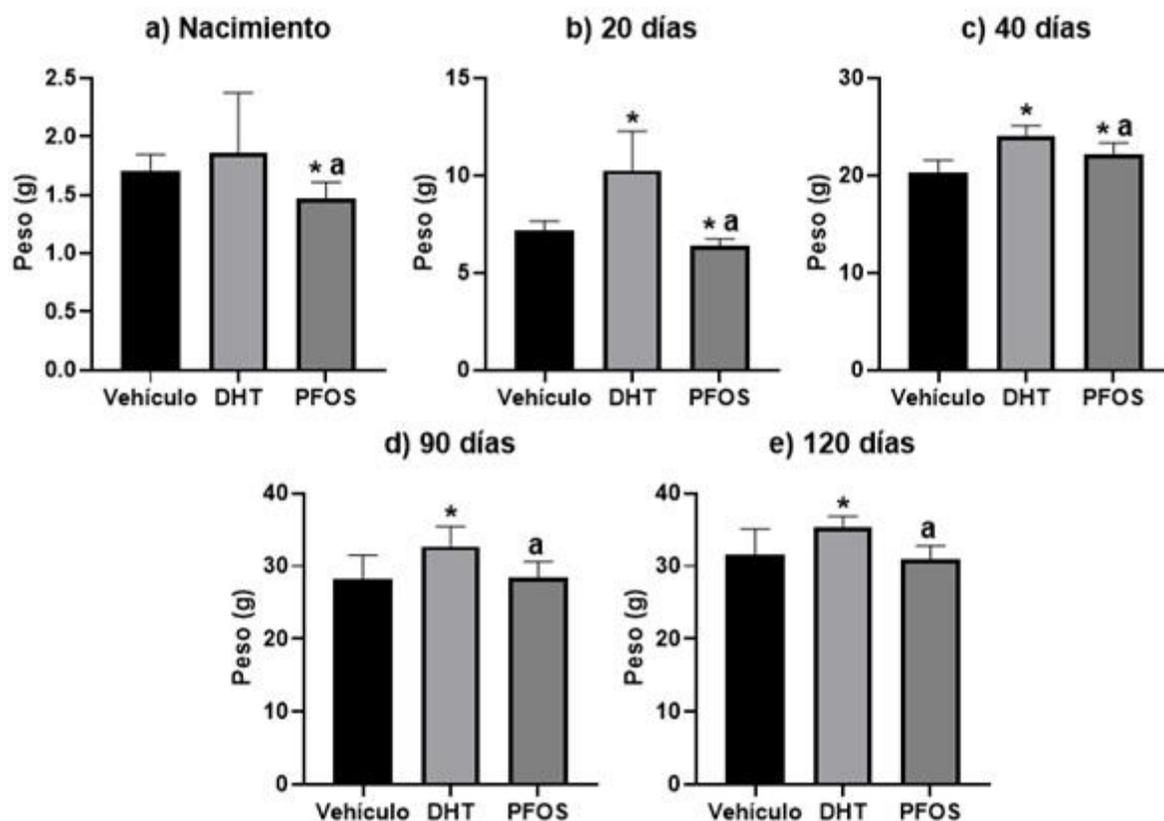


Fig. 2.- Peso registrado en hembras del grupo vehículo, DHT y PFOS al nacimiento, 20, 40, 90 y 120 días de edad (media \pm desviación estándar) (* = diferencia estadísticamente significativa con el grupo vehículo, a = diferencia estadísticamente significativa con el grupo DHT, $P < 0.05$).

10.1.2 Talla.

La exposición durante la gestación a DHT aumenta la talla de las hembras al nacimiento, 20, 40 y 90 días de edad cuando se comparan con el grupo vehículo. Por otra parte, las hembras que fueron expuestas a PFOS mostraron menor talla cuando se compara con el grupo vehículo al nacimiento y a los 120 días, mientras que también resultan con menor talla al nacimiento, 20, y 40 días de edad cuando se comparan con el grupo DHT. La exposición a PFOS durante la gestación reduce la talla de los organismos (Fig. 3).

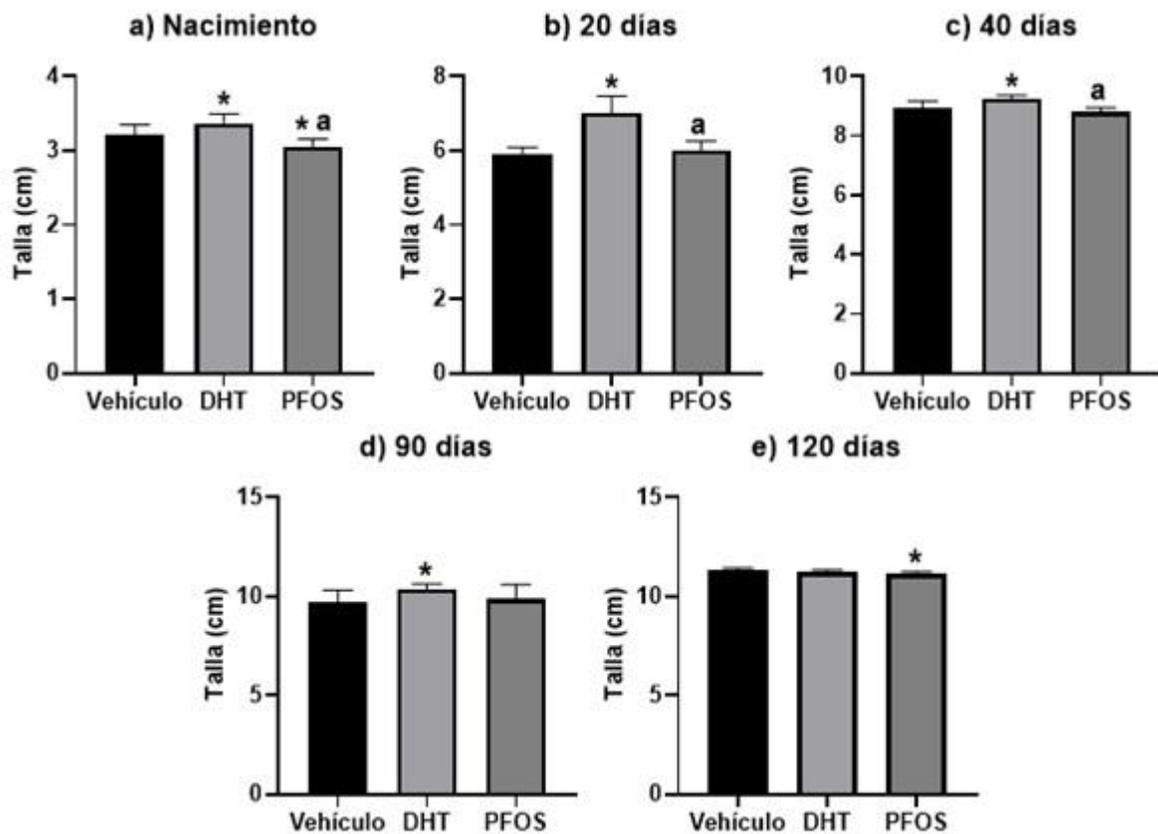


Fig. 3.- Talla registrada en hembras del grupo vehículo, DHT y PFOS al nacimiento, 20, 40, 90 y 120 días de edad (media ± desviación estándar) (* = diferencia estadísticamente significativa con el grupo vehículo, a = diferencia estadísticamente significativa con el grupo DHT, P<0.05).

10.1.3 índice de masa corporal.

Con el fin de saber si los resultados de peso y talla reflejan un estado de obesidad se obtuvo el índice de masa corporal (IMC) que es el resultado de la relación entre el peso y el cuadrado de la talla de los organismos ($\text{peso} / \text{altura}^2$) [50]. La exposición a DHT durante la gestación resultó en el aumento de IMC únicamente a los 120 días de edad cuando se compara con el grupo vehículo. La exposición a PFOS reduce el IMC a los 20 días en comparación al grupo vehículo y DHT; y a los 120 días sólo existe diferencia con el grupo DHT. Por otra parte, PFOS aumentó el IMC en comparación al grupo vehículo a los 40 días. A pesar de que el peso y talla se ven afectados por los diferentes tratamientos durante el desarrollo de los organismos, el IMC solo se afecta a los 20 y 120 días de edad cuando se compara el modelo para SOP con DHT y el grupo experimental PFOS siendo menor en este último (Fig. 4).

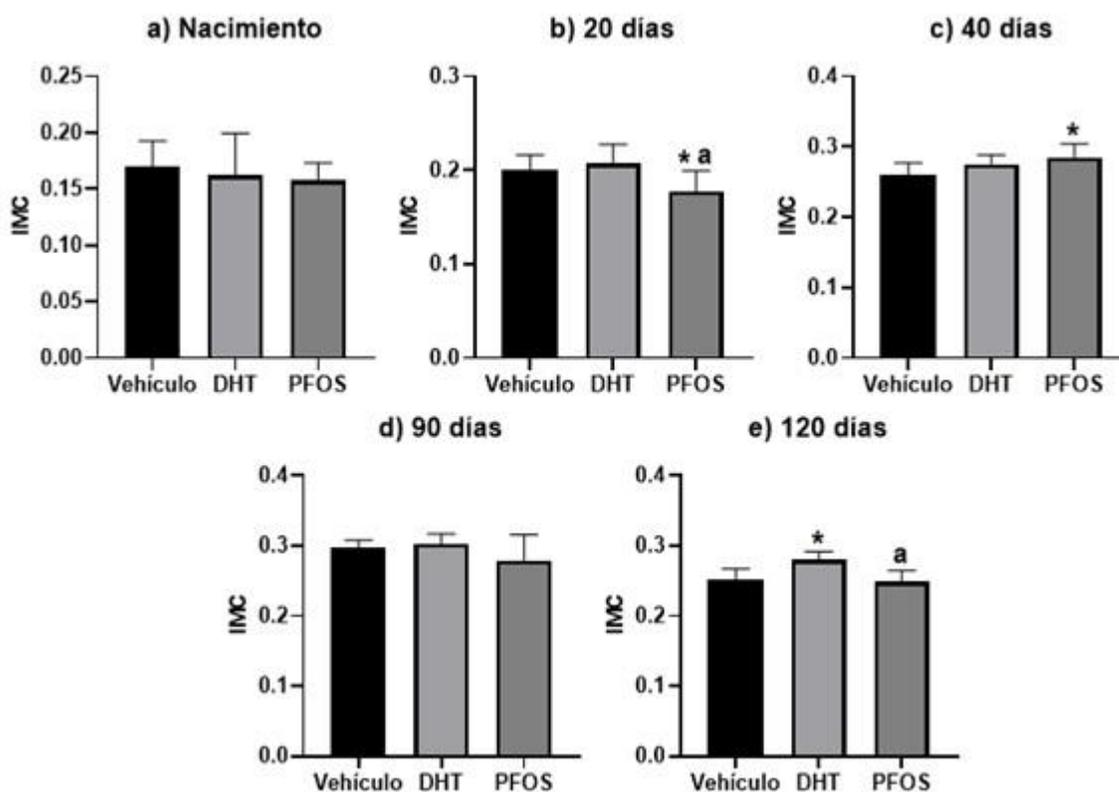


Fig. 4.- IMC registrado en hembras del grupo vehículo, DHT y PFOS al nacimiento, 20, 40, 90 y 120 días de edad (media \pm desviación estándar) (* = diferencia estadísticamente significativa con el grupo vehículo, a = diferencia estadísticamente significativa con el grupo DHT, $P < 0.05$).

10.1.4 Peso del hígado.

En estudios previos se ha observado que la exposición a PFOS produce alteraciones metabólicas y en el hígado [23, 40], por esa razón se analizaron las diferencias en el peso del hígado de hembras tras la exposición a los diferentes tratamientos durante la gestación. Para esto, las muestras de hígado se obtuvieron a los 120 días de edad.

El peso total del hígado en fresco no se altera en los grupos DHT o PFOS en comparación con el vehículo, sin embargo, se registró que PFOS disminuye el peso de este órgano en comparación con el grupo DHT. Por otra parte, el peso relativo del hígado (PRH %) en porcentaje al peso corporal total no se afecta en ninguno de los grupos estudiados (Fig. 5).

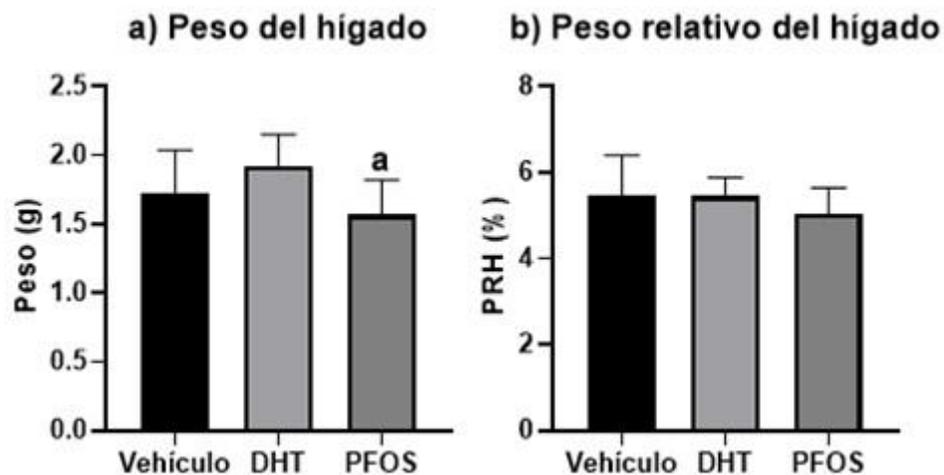


Fig. 5.- a) Peso total del hígado en fresco y b) Peso relativo del hígado (peso del órgano (g) / peso corporal (g)x100) registrados en hembras del grupo vehículo, DHT y PFOS a los 120 días de edad. (media \pm desviación estándar) (* = diferencia estadísticamente significativa con el grupo vehículo, **a** = diferencia estadísticamente significativa con el grupo DHT, $P < 0.05$).

10.1.5 Distancia anogenital.

Es un parámetro utilizado en la toxicología y de forma general es un indicador de la exposición a andrógenos durante el desarrollo embrionario-fetal. Una DAG mayor en hembras es un indicador de la sobre exposición de andrógenos durante la gestación [51, 52]. La exposición a DHT reduce significativamente la DAG en comparación al grupo vehículo y PFOS, pero aumenta a los 20 y 40 días de edad en comparación con el grupo vehículo y a los 90 días aumenta en comparación al grupo PFOS. En contraste, la exposición a PFOS disminuye significativamente la DAG a los 20 y 90 días en comparación al grupo vehículo y DHT, a los 40 días es estadísticamente menor cuando se compara con DHT y a los 120 días de edad es menor en comparación al grupo vehículo. Debido a la exposición a DHT durante la gestación, la DAG aumenta, excepto al nacimiento, donde disminuye. Por el contrario, PFOS disminuye este parámetro excepto al nacimiento, donde se registra un incremento (Fig. 6).

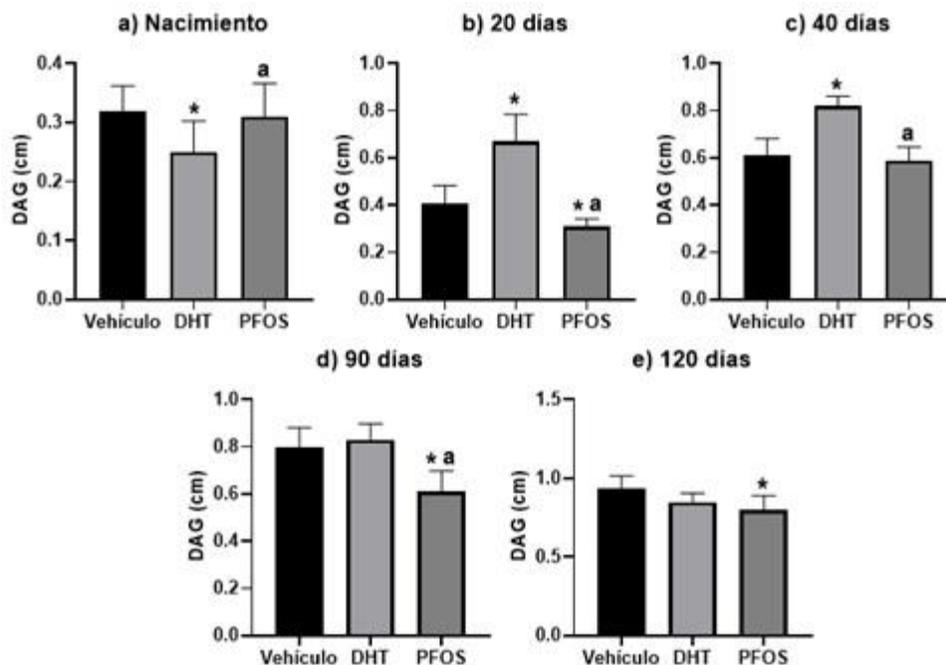


Fig. 6.- DAG registrado en hembras del grupo vehículo, DHT y PFOS al nacimiento, 20, 40, 90 y 120 días de edad (media \pm desviación estándar) (* = diferencia estadísticamente significativa con el grupo vehículo, a = diferencia estadísticamente significativa con el grupo DHT, $P < 0.05$).

10.2 La exposición gestacional a PFOS retarda el inicio de la etapa reproductiva y altera el ciclo estral de forma similar al modelo para SOP por hiperandrogenización con DHT.

Las hembras expuestas a PFOS durante la gestación presentan apertura vaginal tardía, al igual que las hembras del grupo DHT. Una vez que ha iniciado el ciclo estral y se ha presentado el primer estro en las hembras, la mayoría de los animales observados en los grupos DHT y PFOS presentan ciclos heterogéneos y alterados con diestros prolongados.

10.2.1.- Apertura vaginal

La exposición a DHT y PFOS retrasa significativamente el día de la apertura vaginal en comparación con las hebras del grupo vehículo, y con esto retarda la aparición del ciclo reproductivo en las hembras que fueron expuestas durante la gestación. Por otra parte, PFOS retarda aún más el día de apertura vaginal en comparación al grupo DHT (Fig. 7).

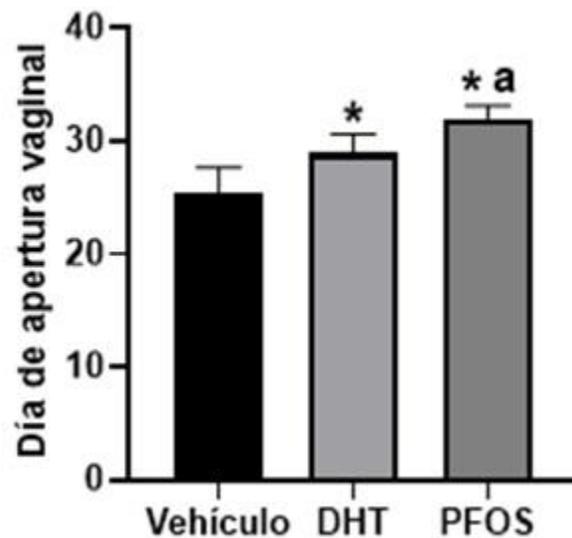


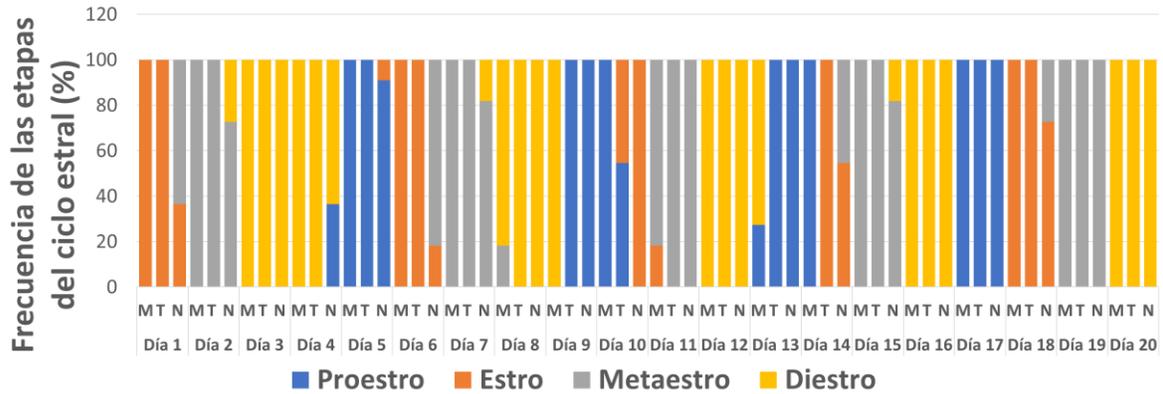
Fig. 7.- PFOS y DHT retardan la apertura vaginal. (media ± desviación estándar) (* = diferencia estadísticamente significativa con el grupo vehículo, **a** = diferencia estadísticamente significativa con el grupo DHT, $P < 0.05$).

10.2.2 Ciclo estral.

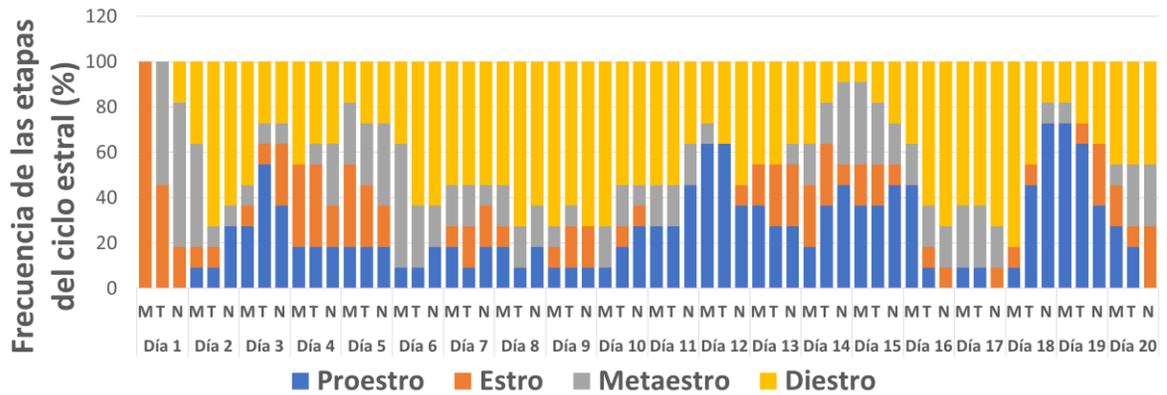
La duración del ciclo estral de ratón CD-1 en condiciones controladas en bioterio es de aproximadamente 4 días [29]. El ciclo estral de las hembras expuestas a los diferentes tratamientos fue registrado desde el día de la apertura vaginal durante 20 días con tres observaciones al día (mañana, tarde y noche). Las hembras del grupo vehículo (a) presentan una distribución homogénea en la aparición de las etapas del ciclo estral donde, después del estro, se observa la llegada del metaestro, diestro y proestro consecutivamente, para después reiniciar el ciclo.

En cuanto a los grupos DHT (b) y PFOS (c), la distribución de las etapas del ciclo estral es heterogénea, donde se observa que la frecuencia de aparición de diestro dentro de las hembras que conformaron los grupos es mayor en comparación al grupo vehículo, esto demuestra que el ciclo estral de hembras expuestas a DHT y PFOS son más largos (Fig. 8).

a) Vehículo



b) DHT



c) PFOS

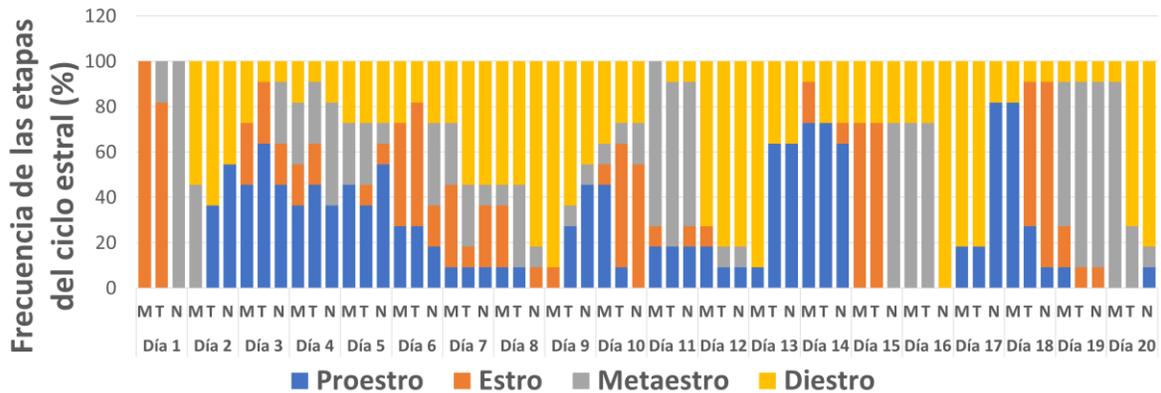


Fig. 8.- Histogramas de la distribución de las etapas del ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro) de los grupos vehículo, DHT y PFOS durante 20 días a partir de la apertura vaginal. (M= mañana, T= tarde, N= noche).

10.2.3 Duración de las etapas del ciclo estral.

Debido a que la distribución en las etapas del ciclo estral en las hembras expuestas a DHT y PFOS resulta alterada, es importante determinar cuáles etapas son diferentes en comparación al grupo control. Para esto se determinó la frecuencia de aparición de las etapas durante el ciclo en el total de todas las observaciones durante los 20 días de seguimiento. Los resultados muestran que la duración del metaestro durante el ciclo disminuye en el grupo DHT y PFOS en comparación con el grupo control. Por otra parte, la duración del diestro aumenta significativamente en el grupo PFOS en comparación con el grupo vehículo y DHT (Fig. 9).

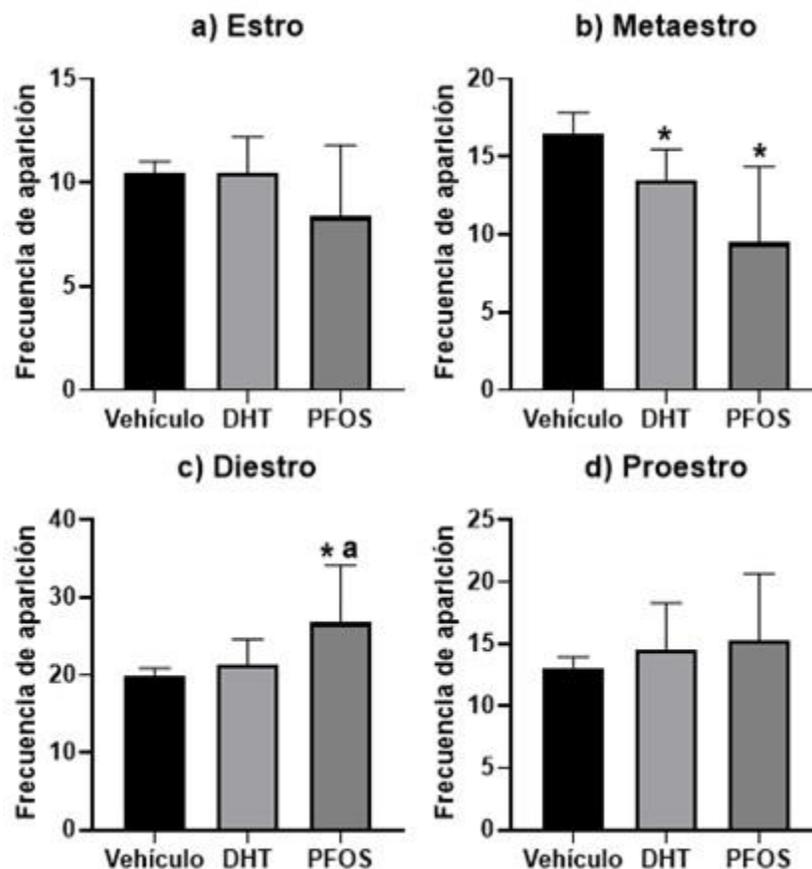


Fig. 9.- Frecuencia de aparición del estro, metaestro, diestro y proestro de los grupos vehículo, DHT y PFOS (media \pm desviación estándar) (* = diferencia estadísticamente significativa con el grupo vehículo, a = diferencia estadísticamente significativa con el grupo DHT, $P < 0.05$).

10.3 Exposición gestacional a PFOS y el modelo para SOP mediante la exposición a DHT elevan los niveles séricos de testosterona en hembras adultas.

Tras la exposición a PFOS durante la gestación, las hembras adultas del grupo PFOS presentan niveles de testosterona en suero elevados, al igual que las hembras del grupo DHT. Mientras que estradiol y progesterona no presentan diferencias estadísticamente significativas. La progesterona presenta disminución importante en los grupos DHT y PFOS, sin embargo, no resulta estadísticamente significativo (Fig. 10).

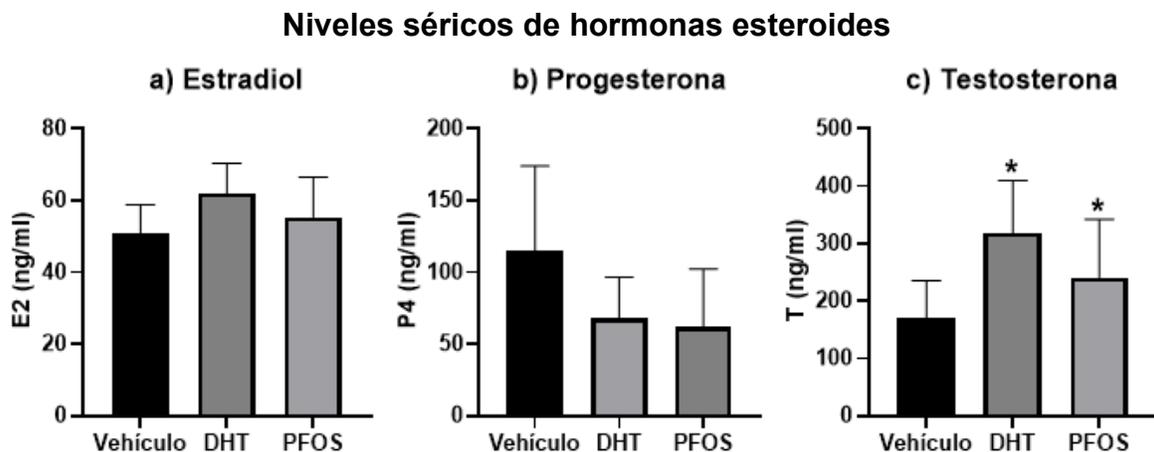


Fig. 10.- Efecto de la exposición a PFOS y DHT sobre los niveles séricos de estradiol, progesterona y testosterona a los 120 días de edad. PFOS eleva los niveles de testosterona en suero al igual que el modelo para SOP por exposición a DHT. (media \pm desviación estándar) (* = diferencia estadísticamente significativa con el grupo vehículo, $P < 0.05$).

10.4 La exposición gestacional a PFOS afecta el desarrollo folicular en hembras adultas de forma similar al modelo para SOP por hiperandrogenización con DHT.

El desarrollo folicular de hembras adultas que fueron expuestas a PFOS durante la gestación se afecta de forma similar a las hembras del grupo DHT.

Se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de folículos secundarios, y folículos antrales de ambos grupos en comparación con las hembras del grupo vehículo. Sin embargo, los folículos en etapas tempranas en la formación del antro no mostraron diferencias. Se observó que las hembras del grupo PFOS desarrollaron menor número de cuerpos lúteos (indicador de ovulación) en comparación con el grupo vehículo, pero no hubo diferencias significativas en comparación con el grupo DHT (Fig. 11).

Los cortes de ovarios de 120 días de las hembras expuestas a PFOS muestran mayor cantidad de folículos atrésicos (Fig. 12), de la misma forma que los ovarios de las hembras expuestas a DHT, en comparación con los ovarios del grupo vehículo, En cortes histológicos de hembras expuestas a PFOS y DHT observamos la presencia de folículos atrésicos, sin embargo, este resultado no fue sometido a un análisis estadístico

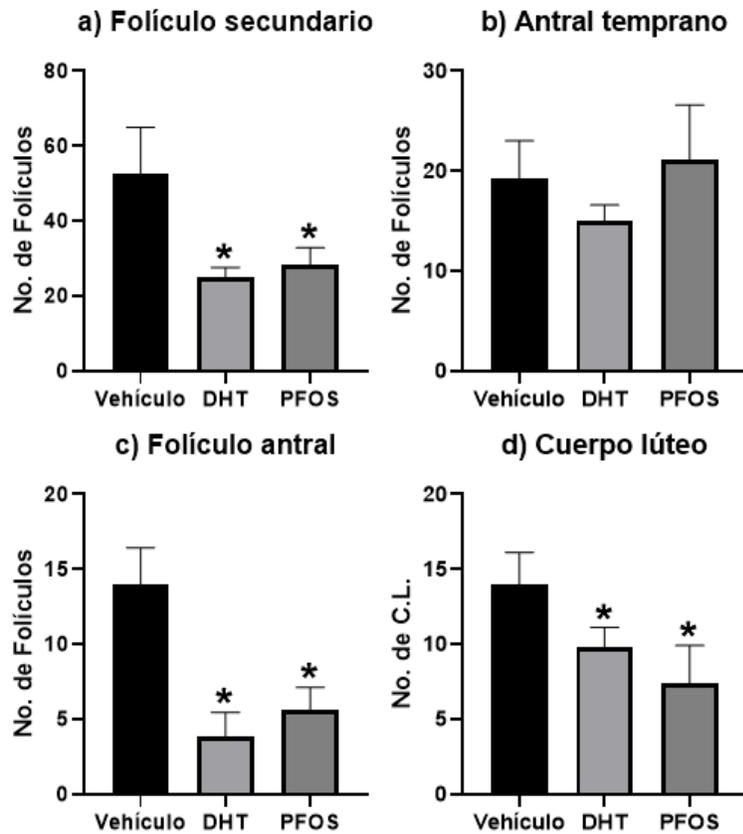


Fig. 11.- Efecto de PFOS y DHT sobre el desarrollo folicular en ovarios de ratones hembra de 120 días de edad. PFOS causa alteraciones en el desarrollo folicular disminuyendo el número de folículos secundarios y antrales, y puede afectar la ovulación ya que se reducen también el número de cuerpos lúteos. (media \pm desviación estándar) (* = diferencia estadísticamente significativa con el grupo vehículo, $P < 0.05$).

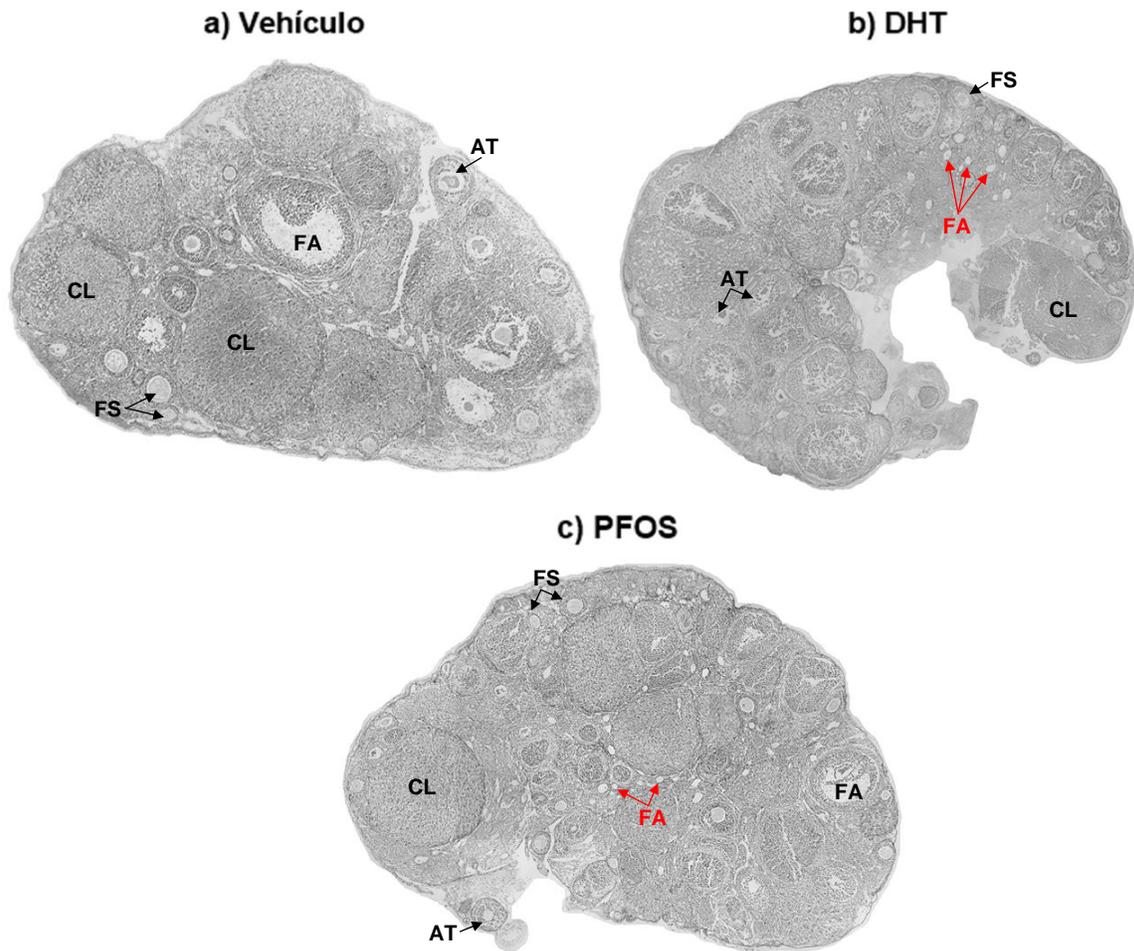


Fig. 12.- Efecto de PFOS y DHT sobre la morfología ovárica a 120 días de edad. FS: Folículo secundario; AT: Antral temprano; FA: Folículo antral; CL: Cuerpo lúteo; FA: Folículo atrésico. Tanto los ovarios del grupo PFOS, como del grupo DHT muestran una morfología alterada ya que se pueden observar una gran cantidad de folículos atrésicos.

11. Discusión.

Los modelos en roedores para SOP basados en hiperandrogenización con DHT expuestos durante la gestación no presentan alteraciones sobre la masa corporal en contraste con aquellos modelos de exposición prepuberal donde se ha observado incremento de este parámetro. [49]. Por lo tanto, la exposición in útero es un buen modelo para el estudio de SOP.

Numerosos estudios realizados en humanos relacionan altas concentraciones de compuestos perfluorados como PFOA y PFOS en suero de mujeres embarazadas y bajo peso de la descendencia al nacimiento, lo que podría deberse a una relación causal [53, 54, 55]. Sin embargo, los estudios hechos en humanos no permiten realizar un seguimiento en los recién nacidos a lo largo de su vida por lo que es difícil decir si existen alteraciones de este tipo en la pubertad o la vida adulta que se relacionen con la exposición gestacional a estos contaminantes. Por esta razón se han realizado diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* donde se evidencia que dichas alteraciones en el peso de neonatos se relacionan con problemas de hepatotoxicidad [54], debido a que el hígado es uno de los principales reservorios donde se bioacumulan los compuestos perfluorados.

Está bien documentado que PFOS puede causar hepatotoxicidad y provocar esteatosis hepática, hepatomegalia, hiperplasia hepatocelular y daño oxidativo de los hepatocitos [56, 57, 58, 59, 60, 61, 62]. Además, se registran anomalías en el metabolismo general de lípidos, ácidos grasos, colesterol, triglicéridos y β -oxidación, así como alteraciones en otras partes del metabolismo como en el ciclo de Krebs y el metabolismo general de la glucosa. [63, 64, 65, 66]. A su vez puede traer como consecuencia problemas en el equilibrio energético de los organismos, así como resistencia a la insulina y eventualmente diabetes tipo dos. Sin embargo, todos estos estudios realizados en su mayoría en modelos roedores utilizan dosis crónicas donde la exposición puede ser desde el nacimiento hasta el inicio de la

etapa reproductiva o durante toda la gestación, aunado a esto, las dosis utilizadas de PFOS son elevadas desde 10 hasta 20 mg/kg/día [54].

En este trabajo se demostró que la exposición a PFOS durante la gestación puede causar disminución en el peso de hembras de la cepa CD-1 desde el nacimiento hasta los 20 días de edad, donde aún no se ha iniciado la etapa reproductiva, sin embargo, en las hembras postpúberes de 40 días de edad esta característica parece invertirse demostrando que las hembras expuestas a PFOS registran una mayor ganancia de peso en comparación con las hembras del grupo vehículo. Este cambio en el peso puede deberse a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, entre otros factores, ya que la liberación de diferentes hormonas puede interferir en el metabolismo, estado energético y finalmente en la reproducción [54, 67]. Sin embargo, cuando comparamos los efectos de PFOS con las hembras del grupo DHT podemos observar que, desde el nacimiento hasta los 120 días de edad, las hembras del grupo PFOS registran un menor peso, ya que en el grupo DHT este parámetro es mayor.

Los estudios previos sobre la exposición a PFOS y la talla de los animales son poco contundentes ya que pueden o no reflejar resultados dependiendo de la dosis, la vía de administración y el tiempo de vida en el que los animales son expuestos, sin embargo, un modelo similar en ratas registra menor talla hasta las 9 semanas de edad [52, 68]. Se sabe que la exposición a PFOS en diferentes modelos de estudio altera la función de la tiroides, disminuye la triyodotironina (T3) y tiroxina (T4), lo cual afecta el metabolismo energético, la termogénesis, el desarrollo del sistema nervioso central y el sistema esquelético [52, 68, 69, 70]. Este trabajo reporta disminución en la talla de las hembras expuestas a PFOS únicamente al nacimiento y a los 120 días de edad en comparación con el grupo vehículo, mientras que DHT produce incremento al nacimiento 20, 40 y 90 días. De forma general, PFOS disminuye el peso en la talla cuando se compara con el modelo DHT al nacimiento, 20 y 40 días de edad.

Como ya se mencionó anteriormente cuando las mujeres adolescentes cursan con SOP presentan incremento de masa y acumulación de grasa en la zona abdominal. En el presente trabajo estimamos la ganancia de masa a través de la medición del IMC. Las hembras adultas a 120 días de vida registran un mayor IMC en comparación con el grupo vehículo, Por el contrario, el grupo experimental PFOS disminuye el IMC a los 20 días y aumenta a los 40 días de edad, este cambio puede estar relacionado al cambio en el metabolismo al entrar a la etapa reproductiva. La exposición a PFOS y DHT muestran diferencias a los 20 y 120 días de edad, siendo menor en el grupo PFOS.

A pesar de los numerosos reportes de que PFOS causa un crecimiento del hígado y diferentes alteraciones hepáticas, en este estudio no observamos diferencias significativas entre el peso fresco del hígado y el peso relativo del hígado en las hembras de 120 días de edad, tratadas con PFOS, cuando se comparan con el grupo vehículo. Sin embargo, El peso del hígado es menor en las hembras expuestas a PFOS en comparación con las hembras del grupo DHT.

En resumen, la exposición a PFOS muestra resultados diferentes en cuanto a los patrones morfométricos en cuanto al modelo para SOP por hiperandrogenización con DHT durante la gestación. Aun con esto, es claro que PFOS puede alterar el metabolismo reflejando alteraciones en los patrones analizados.

Por otra parte, la DAG es indicador de exposición a andrógenos durante el desarrollo embrionario-fetal en mamíferos. Pocos estudios han examinado la asociación entre la exposición prenatal a compuestos perfluorados y DAG y los resultados han sido inconsistentes. Este parámetro suele ser indicativo de alteraciones hormonales relacionados con la exposición de andrógenos o problemas con sus receptores durante la gestación en machos, cuando las hembras exhiben una mayor distancia anogenital suele atribuirse a la sobre exposición androgénica [71, 72].

En este estudio la DAG de las hembras expuestas a PFOS en general resultó ser menor que en las hembras del grupo vehículo, por el contrario, el grupo DHT incremento de la distancia anogenital. La disminución en la distancia anogenital de las hembras expuestas a PFOS puede deberse más bien a efectos teratogénicos y no a elevadas concentraciones de andrógenos durante la gestación [14, 42, 45, 46].

Los primeros síntomas de SOP se presentan, con la llegada de la pubertad. Se sabe que la mayoría de las mujeres con este padecimiento presentan un retardo en la menarca y ciclos reproductivos irregulares con oligo o amenorrea [3, 4, 5]

Un estudio realizado por Du y colaboradores en 2019 donde se utilizaron ratas *Sprague-Dawley*, se determinó que tras la exposición a PFOS en etapa juvenil, las hembras presentan apertura vaginal anticipada en comparación con el grupo control en dosis de 0.1, 1 y 10 mg/Kg durante 5 días (desde el día 26 al 30 de edad), mientras que con otro perfluorado (PFOA), no se registraron diferencias en cuanto al día de apertura vaginal, mencionando que este parámetro reproductivo podría verse alterado por diferentes contaminantes ambientales y no por el periodo de exposición [73].

En el presente estudio se demostró que la exposición a PFOS en etapas tempranas del desarrollo gonadal durante la gestación retarda el inicio de la etapa reproductiva, evidenciando que el periodo de exposición es un factor importante para los parámetros reproductivos, mientras que las hembras expuestas a DHT presentan un resultado similar, donde se retarda la apertura vaginal.

El hecho de presentar retardo en el inicio de la etapa reproductiva está relacionado con la correcta señalización hormonal, ya que no solo encontramos diferencias en la apertura vaginal, sino también en el ciclo estral.

Los ritmos circadianos y los ciclos reproductivos están íntimamente relacionados con el control endocrino en sus diferentes niveles. En mamíferos, estos procesos no solo marcan el inicio de la pubertad, también regulan la aparición del estro y los

periodos de inactividad reproductiva [74, 75]. Está claro que la exposición a DHT y PFOS alteran el ciclo estral de forma similar, haciéndolo irregular, más largo y con diestros prolongados.

En este trabajo demostramos que la exposición a PFOS durante la gestación retarda el día de apertura vaginal y alteran el ciclo reproductivo de las hembras de forma semejante al modelo para SOP. La exposición a PFOS durante la gestación pág. 49 induce problemas de ovulación que podría tener relación con oligo o amenorrea. Diferentes estudios en roedores relacionan la exposición a PFOS con niveles séricos alterados de hormonas esteroides [26, 73]. Dependiendo de los diferentes grados de SOP en general se pueden presentar, andrógenos y estrógenos elevados y progesterona reducida en suero de mujeres con SOP.

La bibliografía disponible actualmente acerca del efecto de compuestos perfluorados sobre la regulación hormonal y esteroidogénesis se enfoca en estudios *in vitro* y modelos roedores en machos. Se sabe que la exposición a estos contaminantes produce bajos niveles de testosterona y altos niveles de estradiol en ratas macho [76], sin afectar los niveles de hormona luteinizante u hormona folículo estimulante [77]. A pesar de los numerosos estudios sobre la exposición a PFOS y las hormonas reproductivas, los resultados siguen siendo poco claros [78].

Se sabe que PFOS puede inhibir algunas enzimas que participan en la síntesis de andrógenos tanto en modelos de roedores *in vivo* y humanos [77, 79, 80]. Los datos apuntan a que la biosíntesis de testosterona se altera en parte por la vía de señalización CREB / CRTC2 / StAR que se ve afectada tras la exposición a diferentes concentraciones de PFOS en modelos de roedores macho. Al final, PFOS disminuye significativamente los niveles de ARNm testicular de StAR, pero no de otras enzimas que participan en la síntesis de hormonas esteroides, como P450scc, P450c17, HSD3 β , HSD17 β y P450arom [81, 82].

Los trabajos realizados con diferentes tipos de líneas celulares mencionan que parte de las alteraciones hormonales de los compuestos perfluorados se debe a la acción que estos compuestos tienen sobre los receptores de andrógenos y estrógenos [83, 84].

Como se mencionó anteriormente, los estudios se enfocan en la reproducción masculina, por lo que los datos sobre las alteraciones endocrinas de PFOS en hembras son escasos y poco consistentes. Aun así, se sabe que PFOS puede alterar las funciones tiroideas, regularidad del ciclo menstrual y provocar insuficiencia ovárica prematura, en diferentes poblaciones en todo el mundo [85]. PFOS está asociado con niveles de testosterona bajos y se asocia negativamente a los niveles séricos de globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) en adolescentes [86, 87]. Sin embargo, en mujeres adultas, PFOS se asocia con niveles elevados de testosterona en suero, lo que podría depender de los cambios que ocurren durante la pubertad en la señalización del eje hipotálamo-hipofisiario-ovárico [88].

Por otra parte, los estudios realizados en roedores hembras sugieren que la exposición a PFOS durante el desarrollo embrionario-fetal podría afectar de forma negativa la reproducción femenina a través de cambios en el desarrollo y la función ovárica [89]. Uno de los principales candidatos para estas afectaciones es la hormona antimülleriana (AMH) que ayuda a regular el proceso de maduración del folículo ovárico [90]. Los niveles de AMH están fuertemente correlacionados con el número de folículos ováricos primordiales o en reposo que se forman durante el desarrollo fetal [91]. En mujeres con SOP, se suelen encontrar concentraciones elevadas de AMH en comparación con mujeres sanas, sin embargo, los estudios de asociación entre las concentraciones plasmáticas de PFOS y los niveles de AMH no arrojan resultados consistentes [92].

En el presente estudio no encontramos cambios estadísticamente significativos en las concentraciones séricas de estradiol, progesterona y testosterona al realizar la

comparación entre los grupos PFOS y DHT. La concentración sérica de testosterona de los grupos PFOS y DHT incrementó en comparación con el grupo vehículo. No hubo diferencias entre los grupos PFOS y DHT en comparación con el grupo vehículo para las concentraciones de estradiol y progesterona. Es importante mencionar que existe una marcada disminución de progesterona tanto en el grupo DHT como en PFOS, sin embargo, no resulta estadísticamente significativo. La administración de PFOS durante etapas tempranas de la gestación produce un incremento de la concentración sérica de testosterona similar al modelo de SOP por administración de DHT.

Existen diferentes estudios donde se observan concentraciones elevadas en suero de diferentes contaminantes ambientales en mujeres con SOP, pero pocos evalúan a los compuestos perfluorados. Sin embargo, Vagi y colaboradores en 2014 informaron que los niveles de PFOS son más altos en suero de mujeres con SOP cuando se compara con mujeres sanas [93, 94, 95]. Para evaluar el efecto de estos contaminantes (que pueden actuar como disruptores endocrinos) sobre la reproducción femenina, se han realizado diferentes modelos en roedores, por ejemplo; la exposición a bisfenol A, da como resultado alteraciones similares a SOP donde se pueden encontrar niveles elevados de testosterona y estradiol, anovulación, quistes ováricos y aumento en la pulsatilidad de GnRH [42, 94].

En cuanto a los modelos para el estudio de SOP, se ha observado que la exposición a andrógenos exógenos e inhibidores de aromatasa en diferentes periodos de la gestación en roedores, arrojan resultados similares; como ciclos estrales irregulares, niveles elevados de testosterona en suero, un aumento en el número de folículos antrales, una disminución en el número de folículos preovulatorios y cuerpos lúteos, aumento en el número de folículos atrésicos y la aparición de quistes foliculares [96, 97]. Pocos estudios han investigado el sistema reproductivo femenino en relación con una alta exposición a compuestos perfluorados, sin embargo, se sabe que la exposición a PFOS en roedores neonatos causan una

reducción en el número de folículos secundarios y reducen el número de folículos en crecimiento en el ovario [73].

Estudios de asociación recientes en diferentes poblaciones informan efectos adversos de los compuestos perfluorados (en particular PFOS) sobre la función ovárica [98]. En EE. UU., se descubrió que niñas con altas concentraciones de PFOS en suero presentaron un inicio tardío en la pubertad y un inicio temprano en la menopausia [99]. A pesar de ello, es escasa e inconsistente la evidencia científica que muestre a los perfluorados como compuestos de interés que pueden producir trastornos reproductivos femeninos [93, 94, 95, 100, 101, 102, 103,104]. Algunos estudios observacionales demuestran que los compuestos perfluorados pueden retrasar la menarca, interrumpir el ciclo reproductivo, causar menopausia precoz e insuficiencia ovárica prematura, alterando también los niveles de hormonas esteroides en suero [85, 105, 106, 107, 108].

Estudios experimentales han demostrado que PFOS causa agotamiento de la reserva ovárica, que se traduce como reducción en los folículos ováricos [73, 109, 110, 111]. En roedores, las hembras adultas expuestas a 0.1 mg de PFOS / kg / día administrados a través de sonda durante 4 meses tuvieron una disminución en el número de folículos preovulatorios y un aumento en el número de folículos atresicos [112]. Ya mencionamos las alteraciones en StAR, y este efecto se propone como una de las causas en los defectos de la maduración folicular [98, 111, 113]. Sin embargo, el efecto exacto de los factores ambientales sobre la disfunción ovulatoria en mujeres con SOP sigue sin estar claro [114].

La formación de los folículos primordiales y el desarrollo folicular ocurre durante las últimas etapas del desarrollo fetal en humanos, pero estos procesos ocurren después del periodo posnatal temprano en roedores; por lo tanto, es posible que los resultados obtenidos en modelos de roedores no se traduzcan directamente a los humanos [115, 116, 117, 118]. La producción prematura de andrógenos puede explicar la detención del desarrollo del folículo antral en el SOP. A pesar de esto,

los folículos de mujeres anovulatorias con SOP siguen sintetizando hormonas esteroideas [119].

Los criterios de Rotterdam generan 4 fenotipos de SOP: SOP clásico con tipo **A**, hiperandrogenismo + ciclos intermitentes / ausentes (disfunción ovulatoria) + morfología de ovario poliquístico; tipo **B**, hiperandrogenismo + disfunción ovulatoria; tipo **C**, hiperandrogenismo + morfología de ovario poliquístico; y tipo **D**, disfunción ovulatoria + morfología de ovario poliquístico [1]. Sin embargo, no hay diagnósticos clínicos veterinarios específicos de especie para el SOP, por lo que las especies no humanas no pueden presentar SOP por definición.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos demuestran que, si bien PFOS no promueve la aparición de quistes foliculares en el ovario, sí disminuye el número de folículos, tanto secundarios como antrales. Esto se puede ligar con disfunción ovárica prematura, ya que muchos de estos folículos que deberían madurar se transforman en folículos atrésicos.

Por lo tanto, la exposición gestacional a PFOS en etapas tempranas de gestación podría estar asociado con el desarrollo de SOP de tipo **B**. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios para determinar si las alteraciones ocasionadas por la administración de PFOS son aisladas, o están relacionadas directamente con el desarrollo de SOP.

12. Conclusiones.

El sulfonato de perfluorooctano altera el desarrollo de ratón CD-1 de forma diferente al modelo para SOP por la exposición a DHT. En cuanto a los patrones morfométricos: El peso, talla e IMC de las hembras resultó ser menor durante el desarrollo de los organismos en el grupo expuesto a PFOS, por el contrario, las hembras expuestas a DHT mostraron un aumento en estos parámetros. PFOS demostró reducir la distancia anogenital, mientras que DHT la aumentó. La disminución causada por PFOS en este parámetro se puede asociar con insuficiencia ovárica, alteración que se presenta también en mujeres con menor DAG. DHT, al aumentar los niveles de andrógenos durante la gestación, aumenta la DAG de la descendencia femenina. Los parámetros reproductivos: día de apertura vaginal, ciclo estral y los niveles hormonales arrojaron resultados similares en ambos grupos. PFOS retardo el día de apertura vaginal, alterando también la duración del ciclo estral presentando diestros más largos, ciclos irregulares y aumentó los niveles de testosterona en suero. PFOS alteró el desarrollo folicular y las hembras presentaron insuficiencia ovárica prematura.

La exposición a PFOS puede estar relacionado con el desarrollo de patologías asociadas con SOP tipo B como niveles elevados de andrógenos en suero e irregularidades en los ciclos reproductivos alterando la ovulación. Sin embargo, no desarrolla quistes ováricos. Estos estudios podrían ser complementados analizando los niveles de otras hormonas como la AMH, LH y FSH, así como análisis en la expresión de RNAs mensajeros que podrían estar relacionados con el metabolismo de SOP y que son alterados por la exposición a PFOS.

13. Bibliografía.

1. Stener-Victorin, E., Padmanabhan, V., Walters, K. A., Campbell, R. E., Benrick, A., Giacobini, P., Dumesic, D. A., & Abbott, D. H. (2020). Animal Models to Understand the Etiology and Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrine Reviews*, 41(4), 538-576. <https://doi.org/10.1210/edrev/bnaa010>
2. March, W. A., Moore, V. M., Willson, K. J., Phillips, D. I. W., Norman, R. J., & Davies, M. J. (2010). The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Human Reproduction*, 25(2), 544-551. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep399>
3. Ravindra, P. V., & Muthukumar, S. P. (2019). Experimental models of polycystic ovary syndrome: An update. *Life Sciences*, 237, 116911. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116911>
4. Mumusoglu, S., & Yildiz, B. O. (2020). Polycystic ovary syndrome phenotypes and prevalence: Differential impact of diagnostic criteria and clinical versus unselected population. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 12, 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2020.03.004>
5. Monniaux, D., Genêt, C., Maillard, V., Jarrier, P., Adriaensen, H., Hennequet-Antier, C., Lainé, A.-L., Lacie, C., Papillier, P., Plisson-Petit, F., Estienne, A., Cognié, J., di Clemente, N., Dalbies-Tran, R., & Fabre, S. (2020). Prenatal programming by testosterone of follicular theca cell functions in ovary. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(6), 1177-1196. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03230-1>
6. Risal, S., Pei, Y., Lu, H., Manti, M., Fornes, R., Pui, H.-P., Zhao, Z., Massart, J., Ohlsson, C., Lindgren, E., Crisosto, N., Maliqueo, M., Echiburú, B., Ladrón de Guevara, A., Sir-Petermann, T., Larsson, H., Rosenqvist, M. A., Cesta, C. E., Benrick, A. & Stener-Victorin, E. (2019). Prenatal androgen exposure and transgenerational susceptibility to polycystic ovary syndrome. *Nature Medicine*, 25(12), 1894-1904. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0666-1>
7. Chappell, N. R., Zhou, B., Schutt, A. K., Gibbons, W. E., & Blesson, C. S. (2020). Prenatal androgen induced lean PCOS impairs mitochondria and mRNA profiles in oocytes. *Endocrine Connections*, 9(3), 261-270. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0553>
8. Dulka, E. A., Burger, L. L., & Moenter, S. M. (2020). Ovarian Androgens Maintain High GnRH Neuron Firing Rate in Adult Prenatally-Androgenized Female Mice. *Endocrinology*, 161(1). <https://doi.org/10.1210/edocr/bqz038>
9. Divyashree, S., Janhavi, P., Ravindra, P. V., & Muthukumar, S. P. (2019). Experimental models of polycystic ovary syndrome: An update. *Life Sciences*, 237, 116911. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116911>

10. Hofmann, T. (2013). Reproductive Toxicology. En H. G. Vogel, J. Maas, F. J. Hock, & D. Mayer (Eds.), *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays* (pp. 1317-1327). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25240-2_58
11. Schwab, M. (Ed.). (2009). Reproductive Toxicology Studies. En *Encyclopedia of Cancer* (pp. 2601-2601). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-47648-1_5048
12. Davidson, E. (2013). Regulatory Assessment of Reproductive Toxicology Data. En P. C. Barrow (Ed.), *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols* (pp. 489-516). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-131-8_33
13. Montesinos-Correa, Hortencia. (2014). Growth and anthropometry: clinical application. *Mexico Pediatric Act*, 35(2), 159-165.
14. Pugh, S., Hinkle, S. N., Ortega-Villa, A., Hediger, M. L., Grobman, W. A., Newman, R. B., Wing, D. A., Albert, P. S., & Grantz, K. L. (2017). 583: Longitudinal changes in maternal anthropometry in relation to neonatal anthropometry: the nichd fetal growth studies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 216(1), S343-S344. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.11.317>
15. Wing, D. A., Ortega-Villa, A. M., Grobman, W. A., Hediger, M. L., Grewal, J., Pugh, S. J., Kim, S., Newman, R., Chien, E., Owen, J., D'Alton, M. E., Wapner, R., Sciscione, A., Albert, P. S., & Grantz, K. L. (2017). Maternal stress and neonatal anthropometry: The NICHD Fetal Growth Studies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 217(1), 82.e1-82.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.02.039>
16. Yang, L., He, L., Xue, J., Ma, Y., Xie, Z., Wu, L., Huang, M., & Zhang, Z. (2020). Persulfate-based degradation of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) in aqueous solution: Review on influences, mechanisms and prospective. *Journal of Hazardous Materials*, 393, 122405. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122405>
17. Schulz, K., Silva, M. R., & Klaper, R. (2020). Distribution and effects of branched versus linear isomers of PFOA, PFOS, and PFHxS: A review of recent literature. *Science of The Total Environment*, 733, 139186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139186>
18. Pontius, F. (2019). Regulation of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonic Acid (PFOS) in Drinking Water: A Comprehensive Review. *Water*, 11(10), 2003. <https://doi.org/10.3390/w11102003>
19. Jeong, Y.-J., Bang, S., Kim, J., Chun, S.-H., Choi, S., Kim, J., Chung, M.-S., Kang, G. J., Kang, Y.-W., Kim, J., Kho, Y., Joo, Y., & Lee, K.-W. (2019). Comparing levels of perfluorinated compounds in processed marine products. *Food and Chemical Toxicology*, 126, 199-210. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.028>

20. Jentsch, A. V., Emery, D., Mareda, J., Nayak, S. K., Metrangolo, P., Resnati, G., Sakai, N., & Matile, S. (2012). Transmembrane anion transport mediated by halogen-bond donors. *Nature communications*, 3, 905. <https://doi.org/10.1038/ncomms1902>
21. Kummu, M., Sieppi, E., Koponen, J., Laatio, L., Vähäkangas, K., Kiviranta, H., Rautio, A., & 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>
22. Pereiro, N. & Lafuente, A. (2012). Perfluorooctane sulfonate toxicology (PFOS) as a model of fluorinated organic compound. *Journal of Toxicology*, 29(2), 107-116.
23. Miralles-Marco, A., & Harrad, S. (2015). Perfluorooctane sulfonate: A review of human exposure, biomonitoring and the environmental forensics utility of its chirality and isomer distribution. *Environment International*, 77, 148-159. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.02.002>
24. Paixão, L., Ramos, R. B., Lavarda, A., Morsh, D. M., & Spritzer, P. M. (2017). Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0231-z>
25. Arnold, A. P. (2020). Sexual differentiation of brain and other tissues: Five questions for the next 50 years. *Hormones and Behavior*, 120, 104691. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104691>
26. Auger, J., Eustache, F., Rouiller-Fabre, V., Canivenc-Lavier, M. C., & Livera, G. (2014). Integrative rodent models for assessing male reproductive toxicity of environmental endocrine active substances. *Asian Journal of Andrology*, 16(1), 60-70. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.122366>
27. Paris, F., Gaspari, L., & Sultan, C. (2017). Maturation of the Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and the Onset of Puberty. *Frontiers in Gynecological Endocrinology*, 57-65. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41433-1_6
28. Vargas, B., Ambriz, D., Navarro, M., Trejo, A., Rodriguez, G. & González, Ma. (2018). Animal management of the UAM-I biorium. Metropolitan Autonomous University unit Iztapalapa, 29. <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/BIOTERIO.pdf>
29. Rey, R. (2001). Dsexual inference in anario-fetal:from molecules to anatomy. *Chilean Journal of Anatomy*, 19(1), 75-82. <https://doi.org/10.4067/S0716-98682001000100012>
30. Jagarlamudi, K., & Rajkovic, A. (2012). Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356(1-2), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.049>

31. Palomba, S. (Ed.). (2018). Infertility in women with polycystic ovary syndrome: pathogenesis and management. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45534-1>
32. Georges, A., Auguste, A., Bessi re, L., Vanet, A., Todeschini, A.-L., & Veitia, R. A. (2014). FOXL2: A central transcription factor of the ovary. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(1), R17-R33. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0159>
33. Matsuda F, Inque N, Manabe N & Ohkura S. (2012) Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells, *Journal of Reproduction and Development*, 58: 44-50.
34. Flores F, Rosas C, Romero M & Pérez M. (2005) Apoptosis and follicular atresia: An essential binomial for ovarian development, *Revista Veterinaria de México*, 36: 87- 103.
35. Ib n ez Toda, L., & Potau Vilalta, N. (2007). Ovary: Estrogens, gestogens, androgens, sex hormone-binding globulin, inhibitions and cariotype. *Endocrinology and Nutrition*, 54(3), 174-181. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(07\)71426-2](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(07)71426-2)
36. Girardi, P., & Merler, E. (2019). A mortality study on male subjects exposed to polyfluoroalkyl acids with high internal dose of perfluorooctanoic acid. *Environmental Research*, 179, 108743. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108743>
37. Mamsen, L. S., J nsson, B. A. G., Lindh, C. H., Olesen, R. H., Larsen, A., Ernst, E. & Andersen, C. Y. (2017). Concentration of perfluorinated compounds and cotinine in human foetal organs, placenta, and maternal plasma. *Science of The Total Environment*, 596-597, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.058>.
38. Pepling M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 44(12), 622–632. <https://doi.org/10.1002/dvg.20258>
39. Stahl, T., Mattern, D., & Brunn, H. (2011). Toxicology of perfluorinated compounds. *Environmental Sciences Europe*, 23(1), 38. <https://doi.org/10.1186/2190-4715-23-38>
40. Paixão, L., Ramos, R. B., Lavarda, A., Morsh, D. M., & Spritzer, P. M. (2017). Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 15(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0231-z>
41. Fernández, M., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., & Libertun, C. (2010). Neonatal exposure to bisphenol a and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environmental health perspectives*, 118(9), 1217–1222. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901257>

42. Zlatnik M. G. (2016). Endocrine-Disrupting Chemicals and Reproductive Health. *Journal of midwifery & women's health*, 61(4), 442–455. <https://doi.org/10.1111/jmwh.12500>
43. Calafat, A. M., Weuve, J., Ye, X., Jia, L. T., Hu, H., Ringer, S., & Hauser, R. (2009). Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environmental health perspectives*, 117(4), 639–644. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800265>
44. Chaparro-Ortega, A., Betancourt, M., Rosas, P., Vázquez-Cuevas, F. G., Chavira, R., Bonilla, E., Casas, E., & Duclomb, 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>
45. Zhao, B., Chu, Y., Hardy, D. O., Li, X. K., & Ge, R. S. (2010). Inhibition of 3beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in rat Leydig cells by perfluorooctane acid. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 118(1-2), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.09.010>
46. Rutkowska, A. Z., & Diamanti-Kandarakis, E. (2016). Polycystic ovary syndrome and environmental toxins. *Fertility and sterility*, 106(4), 948–958. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.031>
47. Fenichel, P., Rougier, C., Hieronimus, S., & Chevalier, N. (2017). Which origin for polycystic ovaries syndrome: Genetic, environmental or both?. *Annales d'endocrinologie*, 78(3), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2017.04.024>
48. Divyashree, S., Janhavi, P., Ravindra, P. V., & Muthukumar, S. P. (2019). Experimental models of polycystic ovary syndrome: An update. *Life Sciences*, 237, 116911. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116911>
49. Urrutia-López, C.A., González-Carranza, L., Betancourt, J.M., Blancas, G., Bonilla, E. & Bahena, I. (2018). Gestational hyperandrogenization induces alterations in glucose metabolism and increases the development of breast tumors in the CD-1 mouse. Presented at the Poster session of the XXIII Symposium of the Department of Health Sciences of the Metropolitan Autonomous University. Mexico City, Mexico. Not published.
50. Fassler, C. S., Pinney, S. E., Xie, C., Biro, F. M., & Pinney, S. M. (2019). Complex relationships between perfluorooctanoate, body mass index, insulin resistance and serum lipids in young girls. *Environmental Research*, 176, 108558. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108558>
51. Christensen, J. V. R., Bangash, K. K., Weihe, P., Grandjean, P., Nielsen, F., Jensen, T. K., & Petersen, M. S. (2021). Maternal exposure to perfluoroalkyl chemicals and anogenital distance in the offspring: A Faroese cohort study. *Reproductive Toxicology*, 104, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.06.016>

52. Steenland, K., Barry, V. & Savitz, D. (2018). Serum perfluorooctane acid and birth weight: an updated meta-analysis with bias analysis. *Epidemiology*, 29 (6), 765-776.
53. Dangudubiyam, S. V., Mishra, J. S., Zhao, H., & Kumar, S. (2020). Perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) exposure during pregnancy increases blood pressure and impairs vascular relaxation mechanisms in the adult offspring. *Reproductive Toxicology*, S0890623820302124. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.09.008>
54. Negri, E., Metruccio, F., Guercio, V., Tosti, L., Benfenati, E., Bonzi, R. & Moretto, A. (2017). Exposure to PFOA and PFOS and fetal growth: a critical combination of toxicological and epidemiological data. *Critical reviews in toxicology*, 47 (6), 489-515.
55. Du, Y., Shi, X., Liu, C., Yu, K. & Zhou, B. (2009). Chronic effects of waterborne PFOS exposure on growth, survival and hepatotoxicity in zebrafish: a partial life cycle test. *Chemosphere*, 74 (5), 723-729.
56. Wan, HT, Zhao, YG, Wei, X., Hui, KY, Giesy, JP & Wong, CK (2012). PFOS-induced hepatic steatosis, mechanical actions on β -oxidation and lipid transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General subjects*, 1820 (7), 1092-1101.
57. Huang, Q., Zhang, J., Peng, S., Du, M., Ow, S., Pu, H., Pan, C., & Shen, H. (2014), Proteomic analysis of perfluorooctane sulfonate-induced apoptosis in human hepatic cells using the iTRAQ technique, *J. Appl. Toxicol.*, 34, pages 1342– 1351, doi: 10.1002/jat.2963
58. Fai Tse, W. K., Li, J. W., Kwan Tse, A. C., Chan, T. F., Hin Ho, J. C., Sun Wu, R. S., Chu Wong, C. K., & Lai, K. P. (2016). Fatty liver disease induced by perfluorooctane sulfonate: Novel insight from transcriptome analysis. *Chemosphere*, 159, 166-177. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.060>
59. Lai, K. P., Li, J. W., Cheung, A., Li, R., Billah, M. B., Chan, T. F., & Wong, C. K. C. (2017). Transcriptome sequencing reveals prenatal PFOS exposure on liver disorders. *Environmental Pollution*, 223, 416-425.
60. Xu, C., Jiang, Z. Y., Liu, Q., Liu, H., & Gu, A. (2017). Estrogen receptor beta mediates hepatotoxicity induced by perfluorooctane sulfonate in mouse. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13414-13423.
61. Zeng, Z., Song, B., Xiao, R., Zeng, G., Gong, J., Chen, M., Xu, P., Zhang, P., Shen, M., & Yi, H. (2019). Assessing the human health risks of perfluorooctane sulfonate by in vivo and in vitro studies. *Environment International*, 126, 598-610. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.002>
62. Reddy, J. K., & Sambasiva Rao, M. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(5), G852-G858.

63. Jacobsen, A. V., Nordén, M., Engwall, M., & Scherbak, N. (2018). Effects of perfluorooctane sulfonate on genes controlling hepatic fatty acid metabolism in livers of chicken embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(23), 23074-23081.
64. Akram, M. (2014). Citric acid cycle and role of its intermediaries in metabolism. *Biochemistry and cellular biophysics* Citric acid cycle and role of its intermediaries in metabolism. *Biochemistry and cellular biophysics*, 68 (3), 475-478.
65. Qiu, T., Chen, M., Sun, X., Cao, J., Feng, C., Li, D., Wu, W., Jiang, L., & Yao, X. (2016). Perfluorooctane sulfonate-induced insulin resistance is mediated by protein kinase B pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477(4), 781-785. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.135>
66. Bao, M., Zheng, S., Liu, C., Huang, W., Xiao, J., & Wu, K. (2020). Perfluorooctane sulfonate exposure alters sexual behaviors and transcriptions of genes in hypothalamic–pituitary–gonadal–liver axis of male zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 267, 115585. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115585>
67. Thibodeaux, J. R., Hanson, R. G., Rogers, J. M., Grey, B. E., Barbee, B. D., Richards, J. H., Butenhoff, J. L., Stevenson, L. A., & Lau, C. (2003). Exposure to Perfluorooctane Sulfonate during Pregnancy in Rat and Mouse. I: Maternal and Prenatal Evaluations. *Toxicological Sciences*, 74(2), 369-381. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg121>
68. Jacobsen, A. V., Nordén, M., Engwall, M., & Scherbak, N. (2018). Effects of perfluorooctane sulfonate on genes controlling hepatic fatty acid metabolism in livers of chicken embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(23), 23074-23081. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2358-7>
69. Conti, A., Strazzeri, C., & Rhoden, K. J. (2020). Perfluorooctane sulfonic acid, a persistent organic pollutant, inhibits iodide accumulation by thyroid follicular cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 515, 110922. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110922>
70. 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>
71. Oñate-Celdrán, J., Arenal-Gonzalo, J. J., Mendiola, J., Samper-Mateo, P., Sánchez-Rodríguez, C., García-Escudero, D., Torres-Roca, M., Vilchez-Costas, A., Adoamnei, E. & Torres-Cantero, A. M. (2019). Analysis of anogenital distance as a diagnostic tool for prostate cancer. *International Journal of Andrology*, 17(2), 60-67.

72. Du, G., Hu, J., Huang, Z., Yu, M., Lu, C., Wang, X., & Wu, D. (2019). Neonatal and juvenile exposure to perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS): Advance puberty onset and kisspeptin system disturbance in female rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 412-421. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.025>
73. Bottalico, L. N., & Weljie, A. M. (2021). Cross-species physiological interactions of endocrine disrupting chemicals with the circadian clock. *General and Comparative Endocrinology*, 301, 113650. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113650>
74. McQuillan, H. J., Han, S. Y., Cheong, I., & Herbison, A. E. (2019). GnRH Pulse Generator Activity Across the Estrous Cycle of Female Mice. *Endocrinology*, 160(6), 1480-1491. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00193>
75. Zhang, H., Lu, Y., Luo, B., Yan, S., Guo, X. & Dai, J. (2014). Proteomic analysis of mouse testicles reveals perfluorooctanoic acid-induced reproductive dysfunction through direct alteration of testicular steroidogenic machinery. *Journal of Proteome Research*, 13(7), 3370-3385
76. Li, L., Li, X., Chen, X., Chen, Y., Liu, J., Chen, F., Ge, F., Ye, L., Lian, Q., & Ge, R.-S. (2018). Perfluorooctane sulfonate impairs rat Leydig cell development during puberty. *Chemosphere*, 190, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.116>
77. Cui, Q., Pan, Y., Wang, J., Liu, H., Yao, B., & Dai, J. (2020). Exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in serum versus semen and their association with male reproductive hormones. *Environmental Pollution*, 266, 115330. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115330>
78. Zhao, B., Hu, G.-X., Chu, Y., Jin, X., Gong, S., Akingbemi, B. T., Zhang, Z., Zirkin, B. R., & Ge, R.-S. (2010). Inhibition of human and rat 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 activities by perfluoroalkylated substances. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1), 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.001>
79. Zhao, B., Li, L., Liu, J., Li, H., Zhang, C., Han, P., Zhang, Y., Yuan, X., Ge, R. S., & Chu, Y. (2014). Exposure to Perfluorooctane Sulfonate In Utero Reduces Testosterone Production in Rat Fetal Leydig Cells. *PLOS ONE*, 9(1), e78888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078888>
80. Qiu, L., Wang, H., Dong, T., Huang, J., Li, T., Ren, H., Wang, X., Qu, J., & Wang, S. (2021). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) disrupts testosterone biosynthesis via CREB/CRTC2/StAR signaling pathway in Leydig cells. *Toxicology*, 449, 152663. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152663>
81. Alam, M. N., Han, X., Nan, B., Liu, L., Tian, M., Shen, H., & Huang, Q. (2021). Chronic low-level perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure promotes testicular steroidogenesis through enhanced histone acetylation. *Environmental Pollution*, 284, 117518. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117518>

82. Qiu, Z., Qu, K., Luan, F., Liu, Y., Zhu, Y., Yuan, Y., Li, H., Zhang, H., Hai, Y., & Zhao, C. (2020). Binding specificities of estrogen receptor with perfluorinated compounds: A cross species comparison. *Environment International*, 134, 105284. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105284>
83. Qu, J., Han, Y., Zhao, Z., Wu, Y., Lu, Y., Chen, G., Jiang, J., Qiu, L., Gu, A., & Wang, X. (2021). Perfluorooctane sulfonate interferes with non-genomic estrogen receptor signaling pathway, inhibits ERK1/2 activation and induces apoptosis in mouse spermatocyte-derived cells. *Toxicology*, 460, 152871. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152871>
84. Zhang, S., Tan, R., Pan, R., Xiong, J., Tian, Y., Wu, J., & Chen, L. (2018). Association of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances With Premature Ovarian Insufficiency in Chinese Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103(7), 2543-2551. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-02783>
85. Lopez-Espinosa, M. J., Mondal, D., Armstrong, B. G., Eskenazi, B., & Fletcher, T. (2016). Perfluoroalkyl substances, sex hormones, and insulin-like growth factor-1 at 6–9 years of age: a cross-sectional analysis within the C8 Health Project. *Environmental health perspectives*, 124(8), 1269-1275.
86. Tsai, M.-S., Lin, C.-Y., Lin, C.-C., Chen, M.-H., Hsu, S. H. J., Chien, K.-L., Sung, F.-C., Chen, P.-C., & Su, T.-C. (2015). Association between perfluoroalkyl substances and reproductive hormones in adolescents and young adults. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(5), 437-443. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.03.008>
87. Wang, Y., Aimuzi, R., Nian, M., Zhang, Y., Luo, K., & Zhang, J. (2021). Perfluoroalkyl substances and sex hormones in postmenopausal women: NHANES 2013–2016. *Environment International*, 149, 106408. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106408>
88. Kristensen, S. L., Ramlau-Hansen, C. H., Ernst, E., Olsen, S. F., Bonde, J. P., Vested, A., Halldorsson, T. I., Becher, G., Haug, L. S., & Toft, G. (2013). Long-term effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl substances on female reproduction. *Human Reproduction*, 28(12), 3337-3348. <https://doi.org/10.1093/humrep/det382>
89. Weenen, C., Laven, JS, Von Bergh, AR, Cranfield, M., Groome, NP, Visser, JA, & Themmen, AP (2004). Pattern of expression of anti-Müllerian hormone in the human ovary: possible implications for initial and cyclic follicle recruitment. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 10 (2), 77-83.
90. Visser, JA, de Jong, FH, Laven, JS & Themmen, AP (2006). Anti-Mullerian hormone: a new marker of ovarian function. *Reproduction*, 131 (1), 1-9.
91. Donley, G. M., Taylor, E., Jeddy, Z., Namulanda, G., & Hartman, T. J. (2019). Association between in utero perfluoroalkyl substance exposure and anti-Müllerian hormone levels in adolescent females in a British cohort.

Environmental Research, 177, 108585.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108585>

92. Vagi, S. J., Azziz-Baumgartner, E., Sjödin, A., Calafat, A. M., Dumesic, D., Gonzalez, L., Kato, K., Silva, M. J., Ye, X., & Azziz, R. (2014). Exploring the potential association between brominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, phthalates, and bisphenol a in polycystic ovary syndrome: A case-control study. *BMC Endocrine Disorders*, 14(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1472-6823-14-86>
93. Wang, W., Zhou, W., Wu, S., Liang, F., Li, Y., Zhang, J., Cui, L., Feng, Y., & Wang, Y. (2019). Perfluoroalkyl substances exposure and risk of polycystic ovarian syndrome related infertility in Chinese women. *Environmental Pollution*, 247, 824-831. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.039>
94. Heffernan, A. L., Cunningham, T. K., Drage, D. S., Aylward, L. L., Thompson, K., Vijayarathy, S., Mueller, J. F., Atkin, S. L., & Sathyapalan, T. (2018). Perfluorinated alkyl acids in the serum and follicular fluid of UK women with and without polycystic ovarian syndrome undergoing fertility treatment and associations with hormonal and metabolic parameters. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(7), 1068-1075. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.07.009>
95. Wang, M.-X., Yin, Q., & Xu, X. (2020). A Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome with Insulin Resistance Induced by Letrozole Combined with High Fat Diet. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e922136-1-e922136-10. <https://doi.org/10.12659/MSM.922136>
96. Walters, K. A., Allan, C. M., & Handelsman, D. J. (2012). Rodent Models for Human Polycystic Ovary Syndrome¹. *Biology of Reproduction*, 86(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097808>
97. Ding, N., Harlow, S. D., Randolph Jr, J. F., Loch-Caruso, R., & Park, S. K. (2020). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and their effects on the ovary. *Human Reproduction Update*, 26(5), 724-752. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa018>
98. Steenland, K., Tinker, S., Frisbee, S., Ducatman, A., & Vaccarino, V. (2009). Association of Perfluorooctanoic Acid and Perfluorooctane Sulfonate With Serum Lipids Among Adults Living Near a Chemical Plant. *American Journal of Epidemiology*, 170(10), 1268-1278. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp279>
99. Trabert, B., Chen, Z., Kannan, K., Peterson, C. M., Pollack, A. Z., Sun, L., & Buck Louis, G. M. (2015). Persistent organic pollutants (POPs) and fibroids: Results from the ENDO study. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 25(3), 278-285. <https://doi.org/10.1038/jes.2014.31>
100. Campbell, S., Raza, M., & Pollack, A. Z. (2016). Perfluoroalkyl substances and endometriosis in US women in NHANES 2003-2006.

- Reproductive Toxicology, 65, 230-235.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.08.009>
101. Buck Louis, G. M., Peterson, C. M., Chen, Z., Hediger, M. L., Croughan, M. S., Sundaram, R., Stanford, J. B., Fujimoto, V. Y., Varner, M. W., Giudice, L. C., Kennedy, A., Sun, L., Wu, Q., & Kannan, K. (2012). Perfluorochemicals and Endometriosis The ENDO Study. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 23(6), 799-805.
<https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31826cc0cf>
102. Wang, B., Zhang, R., Jin, F., Lou, H., Mao, Y., Zhu, W., Zhou, W., Zhang, P., & Zhang, J. (2017). Perfluoroalkyl substances and endometriosis-related infertility in Chinese women. *Environment International*, 102, 207-212.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.03.003>
103. Hammarstrand, S., Jakobsson, K., Andersson, E., Xu, Y., Li, Y., Olovsson, M., & Andersson, E. M. (2021). Perfluoroalkyl substances (PFAS) in drinking water and risk for polycystic ovarian syndrome, uterine leiomyoma, and endometriosis: A Swedish cohort study. *Environment International*, 157, 106819. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106819>
104. Lopez-Espinosa, M.-J., Fletcher, T., Armstrong, B., Genser, B., Dhatariya, K., Mondal, D., Ducatman, A., & Leonardi, G. (2011). Association of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) with Age of Puberty among Children Living near a Chemical Plant. *Environmental Science & Technology*, 45(19), 8160-8166.
<https://doi.org/10.1021/es1038694>
105. Zhou, W., Zhang, L., Tong, C., Fang, F., Zhao, S., Tian, Y., Tao, Y., & Zhang, J. (2017). Plasma Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances Concentration and Menstrual Cycle Characteristics in Preconception Women. *Environmental Health Perspectives*, 125(6), 067012.
<https://doi.org/10.1289/EHP1203>
106. Taylor, K. W., Hoffman, K., Thayer, K. A., & Daniels, J. L. (2014). Polyfluoroalkyl Chemicals and Menopause among Women 20–65 Years of Age (NHANES). *Environmental Health Perspectives*, 122(2), 145-150.
<https://doi.org/10.1289/ehp.1306707>
107. Barrett, E. S., Chen, C., Thurston, S. W., Haug, L. S., Sabaredzovic, A., Fjeldheim, F. N., & Thune, I. (2015). Perfluoroalkyl substances and ovarian hormone concentrations in naturally cycling women. *Fertility and sterility*, 103(5), 1261-1270. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.02.001>
108. López-Arellano, P., López-Arellano, K., Luna, J., Flores, D., Jiménez-Salazar, J., Gavia, G., Teteltitla, M., Rodríguez, J. J., Domínguez, A., Casas, E., Bahena, I., Betancourt, M., González, C., Ducolomb., & Bonilla, E. (2019). Perfluorooctanoic acid disrupts gap junction intercellular communication and induces reactive oxygen species formation and apoptosis in mouse ovaries. *Environmental Toxicology*, 34(1), 92-98. <https://doi.org/10.1002/tox.22661>

109. Hallberg, I., Kjellgren, J., Persson, S., Örn, S., & Sjunnesson, Y. (2019). Perfluorononanoic acid (PFNA) alters lipid accumulation in bovine blastocysts after oocyte exposure during in vitro maturation. *Reproductive Toxicology*, 84, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.11.005>
110. Chen, Y., Zhou, L., Xu, J., Zhang, L., Li, M., Xie, X., & Kuang, H. (2017). Maternal exposure to perfluorooctanoic acid inhibits luteal function via oxidative stress and apoptosis in pregnant mice. *Reproductive Toxicology*, 69, 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.02.010>
111. Feng, X., Cao, X., Zhao, S., Wang, X., Hua, X., Chen, L., & Chen, L. (2017). Exposure of Pregnant Mice to Perfluorobutanesulfonate Causes Hypothyroxinemia and Developmental Abnormalities in Female Offspring. *Toxicological Sciences*, 155(2), 409-419. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw219>
112. Feng, X., Wang, X., Cao, X., Xia, Y., Zhou, R., & Chen, L. (2015). Chronic Exposure of Female Mice to an Environmental Level of Perfluorooctane Sulfonate Suppresses Estrogen Synthesis Through Reduced Histone H3K14 Acetylation of the StAR Promoter Leading to Deficits in Follicular Development and Ovulation. *Toxicological Sciences*, 148(2), 368-379. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv197>
113. Zhang, B., Zhou, W., Shi, Y., Zhang, J., Cui, L., & Chen, Z.-J. (2020). Lifestyle and environmental contributions to ovulatory dysfunction in women of polycystic ovary syndrome. *BMC Endocrine Disorders*, 20(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12902-020-0497-6>
114. Skinner, M. K. (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*, 11(5), 461-471. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi020>
115. Bristol-Gould, S. K., Kreeger, P. K., Selkirk, C. G., Kilen, S. M., Cook, R. W., Kipp, J. L., Shea, L. D., Mayo, K. E., & Woodruff, T. K. (2006). Postnatal regulation of germ cells by activin: The establishment of the initial follicle pool. *Developmental Biology*, 298(1), 132-148. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.025>
116. van Houten, E. L. A. F., & Visser, J. A. (2014). Mouse models to study polycystic ovary syndrome: A possible link between metabolism and ovarian function? *Reproductive Biology*, 14(1), 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.09.007>
117. Kuyucu, Y., Sencar, L., Tap, Ö., & Mete, U. Ö. (2020). Investigation of the effects of vitamin D treatment on the ovarian AMH receptors in a polycystic ovary syndrome experimental model: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Reproductive Biology*, 20(1), 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.01.001>

118. Franks, S., Mason, H., & Willis, D. (2000). Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163(1-2), 49-52. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00239-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00239-7)

