

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL A
FTALATOS E NANOPLÁSTICOS: IMPACTO SOBRE
DESENVOLVIMENTO GONADAL MASCULINO**

MIRELLA FRANCO MOREIRA

Botucatu – SP

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL A
FTALATOS E NANOPLÁSTICOS: IMPACTO SOBRE
DESENVOLVIMENTO GONADAL MASCULINO**

MIRELLA FRANCO MOREIRA

Orientador: Prof. Titular Wellerson Rodrigo Scarano

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral
e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular,
Estrutural e Funcional

Wellerson Rodrigo Scarano

**Botucatu – SP
2025**

M838e Moreira, Mirella Franco
EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL A
FTALATOS E NANOPLÁSTICOS: IMPACTO SOBRE
DESENVOLVIMENTO GONADAL MASCULINO /
Mirella Franco Moreira. -- Botucatu, 2026
78 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano

1. desenvolvimento fetal. 2. exposição materna. 3.
ftalatos. 4. nanoplásticos. 5. testículo. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa:

A onipresença dos nanoplásticos, sobretudo quando associados a aditivos químicos como os ftalatos, representa um desafio emergente tanto para o meio ambiente quanto para a saúde pública. Evidências demonstram que esses poluentes são capazes de atravessar a barreira placentária, alcançando o feto e potencialmente comprometendo o desenvolvimento saudável da prole. Entre os principais efeitos, destacam-se alterações na função hormonal e na saúde reprodutiva masculina, o que desperta grande preocupação diante do aumento progressivo das taxas de infertilidade observadas globalmente nas últimas décadas.

Nesse cenário, compreender os impactos da exposição *in utero* e durante a lactação a uma mistura de ftalatos e nanoplásticos sobre o desenvolvimento testicular dos descendentes faz-se necessário. Assim, os resultados desta pesquisa contribuem de forma inédita para a literatura sobre coexposição a ftalatos e nanoplásticos, oferecendo evidências científicas dos efeitos na reprodução masculina em diferentes períodos da vida. Mais do que ampliar o conhecimento acadêmico, os achados têm o potencial de gerar subsídios para a formulação de políticas públicas voltadas à redução de sua produção, ao incentivo de práticas de consumo e descarte responsáveis e à promoção de ações educativas voltadas à conscientização da sociedade, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, especialmente o ODS 3 (saúde e bem-estar) e o ODS 12 (consumo e produção responsáveis), em direção a um futuro mais sustentável, seguro e comprometido com a saúde humana e suas gerações.

Potential impact of this research:

The ubiquity of nanoplastics, especially when combined with chemical additives such as phthalates, poses an emerging challenge for both the environment and public health. Evidence shows that these pollutants can cross the placental barrier, reaching the fetus and potentially compromising the healthy development of offspring. Among the main effects are alterations in hormonal function and male reproductive health, which raises great concern given the progressive increase in infertility rates observed globally in recent decades.

In this context, understanding the impacts of *in utero* and lactation exposure to a mixture of phthalates and nanoplastics on the testicular development of offspring is essential. Thus, the results of this research contribute in an unprecedented way to the literature on co-exposure to phthalates and nanoplastics, offering scientific evidence of the effects on male reproduction at different stages of life. More than expanding academic knowledge, the findings have the

potential to generate subsidies for the formulation of public policies aimed at reducing its production, encouraging responsible consumption and disposal practices, and promoting educational actions aimed at raising awareness in society, aligning with the UN Sustainable Development Goals, especially SDG 3 (health and well-being) and SDG 12 (responsible consumption and production), towards a more sustainable, safe future that is committed to human health and its generations.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Exposição Intrauterina e Lactacional a Ftalatos e Nanoplásticos: impacto sobre desenvolvimento gonadal masculino

AUTORA: MIRELLA FRANCO MOREIRA

ORIENTADOR: WELLERSON RODRIGO SCARANO

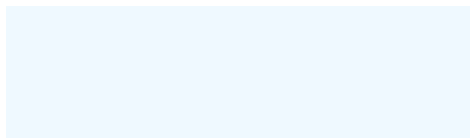
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia Celular Estrutural e Funcional pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WELLERSON RODRIGO SCARANO (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Profa. Dra. PATRICIA FERNANDA FELIPE PINHEIRO (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Profa. Dra. JULIANA ELAINE PEROBELLI (Participação Virtual)
Depto. Ciências do Mar / Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Botucatu, 20 de fevereiro de 2026.



Renan Codeco da Silva
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu
Rua Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, 18618689
<https://www.ibb.unesp.br/#!/ensino/pos-graduacao/programas-stricto-sensu/pg-biologia-geral-e-aplicada/> - CNPJ: 48031918002259.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** por me guiar pelos melhores caminhos, e por me conceder resiliência, sabedoria e todas as bênçãos que recebo.

Agradeço à minha família. À minha mãe, **Cláudia Franco** (*in memoriam*), por ter dedicado sua vida a mim e às minhas irmãs, oferecendo amparo, incentivo e amor, por nunca me deixar desistir dos meus sonhos e, principalmente, pela educação, herança mais preciosa que carrego e que me permitiu alcançar voos mais altos. Ao meu pai, **José Mário Moreira**, por todo suporte e incentivo, pelos momentos descontraídos e por estar presente nos períodos mais difíceis. Às minhas irmãs, **Larissa** e **Giovanna**, por serem meu suporte diário, minha fonte de inspiração e força, por não me deixarem desistir e por caminharem comigo em todos os momentos. Ao meu namorado, **Arthur Noronha**, por ser meu companheiro em todas as horas, por vibrar genuinamente pelas minhas conquistas, me apoiar, aconselhar e devolver alegria e leveza aos meus dias. Atribuo minhas conquistas à minha família; sem vocês, eu não seria nem teria nada do que sou e conquistei. Amo vocês.

Ao meu orientador, **Wellerson Scarano**, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de desenvolver uma pesquisa tão relevante. Sou grata por me permitir atuar em um laboratório estruturado, pela disponibilidade em dialogar e por sempre acolher ideias.

Aos membros do **LabDECA**, agradeço pela dedicação a este trabalho, pelo companheirismo e por compartilharem seus conhecimentos. Em especial, agradeço aos meus amigos de laboratório e de vida, à **Natália Magosso**, por se colocar sempre à disposição com entusiasmo para ensinar, pela sua sensibilidade, pelas conversas que enriquecem os dias no laboratório e pelo grande incentivo e carinho constantes. Ao **Patrick Vieira**, pelos ensinamentos, entusiasmo, risadas, apoio e por tornar a rotina no laboratório mais leve, alegre e com muita ciência, sempre enxergando o melhor em todos. À **Isabela Ferreira** pela amizade e confiança em coorientar sua iniciação científica, ensinar e aprender com você foi uma experiência muito especial. À **Victoria Pinha** e à **Isabela Favaro**, pela amizade e pelas contribuições à pesquisa. Agradeço por me acolherem desde o início, por serem meu suporte em Botucatu e tornar os dias mais animados e de muita pesquisa.

Aos amigos do departamento, em especial, ao **Matheus Fioretto** pelos grandes aprendizados, pela atenção dedicada aos nossos resultados, pelos questionamentos pertinentes e pelo incentivo constante à reflexão científica. À **Luísa Annibal**, pelo incentivo, amizade e carinho dentro e fora do laboratório.

À minha psicóloga, **Kamylla Arantes**, por estar presente nos dois anos mais difíceis da minha vida, por não me deixar desistir, por me acolher, fortalecer e ensinar a olhar para mim com mais carinho. Obrigada pelos conselhos, pelo cuidado e por insistir em mim.

À **Andressa Jacinto** por ser uma roommate tão especial, por estar sempre disposta a conversar, rir e sair comigo, além de estar ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

À minha amiga da graduação, **Maysa Cavalcante**, por ser minha parceira de conversas, desabafos e risadas, por compreender minhas angústias e torcer genuinamente por mim. Às minhas amigas do ensino médio, **Maria Júlia Bastos**, **Júlia Lazarini** e **Vitória Freitas**, por permanecerem presentes mesmo com a vida acontecendo. Levo comigo com carinho os momentos bons da adolescência que vivi ao lado de vocês.

A todos os técnicos administrativos e funcionários da UNESP, em especial do Departamento de Morfologia, com destaque para **Keila Emílio**, **Ricardo Teixeira** e **José Eduardo**, pela disponibilidade e atenção em auxiliar. À **Paula**, responsável pela limpeza do departamento, pelo cuidado e paciência, mesmo diante da rotina do laboratório.

Aos **animais de laboratório**, expressei minha gratidão e respeito, reconhecendo sua contribuição para a realização deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** e ao **Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo 2024/03207-0 e 2024/02800-9, agradeço o apoio financeiro durante a realização do mestrado.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABP: proteína ligadora de androgênio	GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
AGD: anogenital distance	GD: gestacional day
AMH: anti-mullerian hormone	GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas
AR: androgen receptor	GP-x: glutathione peroxidase
BBzP: ftalato de benzila butila	GR: glutathione reductase
BHT: barreira hematotesticular	GSH: reduced glutathione
BTB: blood-testis barrier	GSSG: oxidized glutathione
BW: body weight	GST: glutathione S-transferase
CAT: catalase	HE: hematoxylin-eosin
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais	HHG: hipotálamo-hipófise-gônada
CL: célula de Leydig	HS17B1: hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 1
CLF: célula de Leydig fetal	IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	INSL3: insulina-3
CS: célula de Sertoli	LC: Leydig cell
CTRL: controle	LH: hormônio luteinizante
DAG: distância anogenital	MDA: malondialdehyde
DBP: di-n-butila ftalato	MEHP: mono-(2-etilhexil) ftalato
DEHP: bis(2-etilhexil)ftalato	MF: mistura de ftalatos
DEP: dietilftalato	MNPS: micro nanoplásticos
DEs: desreguladores endócrinos	MPs: microplásticos
DG: dia gestacional	Mt: milhões de toneladas
DHT: diidrotestosterona	NPs: nanoplásticos
DiBP: ftalato de diisobutil	OCLN: occludin
DiNP: ftalato de diisononila	ODS: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
DOHaD: Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença	PM: phthalate mixture
DPN: dia pós-natal	PS: preputial separation
ERO: espécies reativas de oxigênio	
FSH: hormônio folículo-estimulante	

PND: Postnatal day	TBARS: thiobarbituric acid-reactive substances
ROS: reactive oxygen species	TG: total glutathione
SC: Sertoli cell	TGFB2: transforming growth factor beta
SOD: superoxide dismutase	2
SRD5A1: steroid 5-alpha-reductase	TJP1: tight junction protein 1
StAR: proteína reguladora aguda esteroidogênica	

CAPÍTULO I

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema ilustrativo do conceito DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), demonstrando como exposições precoces durante a gestação, incluindo fatores metabólicos, nutricionais, hormonais e ambientais, como nanoplásticos e ftalatos provenientes de diferentes fontes de contaminação, podem induzir modificações epigenéticas. Essas alterações epigenéticas podem programar o desenvolvimento ao longo da vida, resultando em desfechos que variam de um desenvolvimento saudável até alterações hormonais e prejuízos na fertilidade masculina. 20
- Figura 2.** Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas, as análises e a composição da mistura de ftalatos (MF). Imagem criada em BioRender.com. 26
- Figura 3.** Efeito da exposição gestacional à uma mistura de ftalatos e nanoplástico em ratos descendentes no DG 20 sobre os níveis relativos de mRNA em genes do desenvolvimento e maturação testicular e em genes da via esteroidogênica. **(a)** Hormônio anti-mulleriano (Amh). **(b)** Insulina-3 (Ins13) **(c)** Receptor de andrógeno (Ar). **(d)** 17-beta desidrogenase 1 (Hsd17b1). **(e)** Steroid 5 alpha-reductase 1 (Srd5a1). **(f)** Aromatase (Cyp19a1). A expressão gênica é dada pela quantificação de $2^{\Delta\Delta CT}$ e os dados foram analisados por ANOVA quando paramétricos, seguido pelo teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis quando não paramétricos, seguido pelo teste de Dunn e os valores foram expressos como média $\pm$ DP; n = 4-6/grupo e significativos quando *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, ***P $\leq$ 0,001..... 29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Efeito da exposição aos poluentes plásticos no peso corporal (n = 8–10/grupo), peso testicular absoluto (n = 7–8/grupo), peso testicular relativo (n = 7–8/grupo) e na distância anogenital absoluta (n = 8–10/grupo) e ajustada (n = 8–10/grupo) em descendentes no período fetal. Os dados foram analisados por ANOVA quando paramétricos, seguido pelo teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis quando não paramétricos, seguido pelo teste de Dunn e os valores foram expressos como média $\pm$ DP; e significativos quando *P $\leq$ 0,05..... 28

CAPÍTULO II

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. The experimental design includes the treatment protocol, experimental groups, administered doses, and the composition of the phthalate mixture (PM). Pregnant Sprague Dawley rats received daily oral treatment from gestational day 10 (GD10) until postnatal day 21 (PND21). Animals were randomly assigned to six groups: CTRL (control group), vehicle (corn oil/water); T1, 20 µg/kg/day of PM; T2, 200 mg/kg/day of PM; T3, 1 mg/kg/day of 100 nm nanoplastics (NPs); T4, 20 µg/kg/day of PM + 1 mg/kg/day of NPs; and T5, 200 mg/kg/day of PM + 1 mg/kg/day of NPs. At the end of the lactation period (PND21), male offspring were euthanized at two time points—PND22 (prepubertal) and PND120 (adult). Testes were collected for histological and molecular analyses, as well as evaluation of the oxidative profile. 47

Figure 2. Measurement of anogenital distance on PND1 and 22 and monitoring of prepuce separation age in male offspring. (a) Anogenital distance on PND1 (n = 8/group). (b) Anogenital distance on PND 22 (n = 8–10/group). (c) Age of preputial separation (n = 7–9/group). Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean ± SD; and significant when *P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01. 55

Figure 3. Quantification of the mean number of spermatocytes in the pachytene stage in seminiferous tubules of rats on PND22. (a) Representative photomicrograph of seminiferous tubules with pachytene spermatocytes undergoing apoptosis in the T5 group, highlighted by the arrow. (b) Quantification of the mean number of pachytene spermatocytes undergoing apoptosis per tubule on PND22 (n = 6–7/group). Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean ± SD; and significant when *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01. 56

Figure 4. (a, b) Representative photomicrograph of the control group testis in stage IX of spermatogenesis, stained with hematoxylin and eosin. The four diameter measurements are indicated in black dashed lines, while the four germinal epithelium height measurements are indicated in solid gray lines. Objective 20x (a) and 40x (b). Abbreviations: i - interstitium; lu - lumen; ge - germinal epithelium; st - seminiferous tubule; Sc - Sertoli cell; Lc - Leydig cell. (c) Mean diameter of the seminiferous tubule (µm). (d) Mean height of the germinative epithelium (µm). (e) Quantification of the mean number of Sertoli cells per tubule. (f) Quantification of the mean number of Leydig cells. Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean ± SD; (n = 4–7/group) and significant when *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001. 57

Figure 5. Histopathological analysis of seminiferous tubules. (a) Graph showing the percentage of vacuolization in the seminiferous tubule. (b) Graph showing the percentage of immature germ cells in the tubule lumen. Representative photomicrographs of histopathological findings at 200x magnification. (c) Vacuolization ►(arrow). (d) Germ cells in the seminiferous tubule lumen (circle). (e) Presence of acidophilic cells ↑(arrow). (f) Degeneration of the germinative epithelium. Values are expressed as mean ± standard deviation (n=5/group). ANOVA followed by Tukey's post-test. Significant when *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Abbreviations: i- interstitium, ge- germinative epithelium, lu- lumen. 58

Figure 6. Effect of gestational and lactational exposure to a mixture of phthalates and nanoplastics in offspring rats on PND22 on relative mRNA levels in genes involved in testicular development and maturation and the steroidogenic pathway. (a) Anti-Müllerian hormone (*Amh*). (b) Insulin-3 (*Ins13*). (c) Androgen receptor (*Ar*). (d) 17-beta dehydrogenase 1 (*Hsd17b1*). (e) Aromatase (*Cyp19a1*). (f) Steroid 5 alpha-reductase 1 (*Srd5a1*). Gene expression is given by the quantification of $2^{-\Delta\Delta CT}$ and data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean ± SD; n = 4–5/group and significant when *P ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, and ****P ≤ 0.0001. 59

Figure 7. Late effect (PND120) of gestational and lactational exposure to a mixture of phthalates and nanoplastics in rat offspring on relative mRNA levels in genes of the blood-testis barrier junction and in the growth factor gene. (a) Occludin (Ocln). (b) Tight junction protein 1 (Tjp1). (c) Transforming growth factor beta 2 (Tgfβ2). Gene expression is given by the quantification of $2^{-\Delta\Delta CT}$ and data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; n = 4–5/group; and significant when *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01. 60

Figure 8. Oxidative stress analysis on postnatal days 22 and 120. (a) Superoxide dismutase on PND 22. (b) Catalase on PND 22. (c) Thiobarbituric acid reactive substances on PND 22. (d) Total glutathione on PND 22. (e) Oxidized glutathione on PND 22. (f) Reduced glutathione on PND 22. (g) Glutathione S-transferase on PND 22. (h) Superoxide dismutase at PND 120. (i) Catalase on PND 120. (j) Thiobarbituric acid reactive substances at PND 120. (k) Total glutathione on PND 120. (l) Oxidized glutathione on PND 120. (m) Reduced glutathione on PND 120. (n) Glutathione S-Transferase on PND 120. Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; (n = 4–5/group/age); and significant when *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01, ***P $\leq$ 0.001, and ****P $\leq$ 0.0001. 62

LISTA DE TABELAS

Table 1. Effect of exposure to plastic pollutants on body weight and absolute testicular weight at PND22 (n = 7–9/group) and PND120 (n= 7–9/group) in male offspring rats. Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; and significant when *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01. 53

APPENDIX

Table 1. Sequence of the primers used for the RT-qPCR analysis, containing the access codes of the analyzed targets (GenBank). 77

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - ALTERAÇÕES TESTICULARES EM FETOS MACHOS EXPOSTOS A MISTURA DE FALATOS E NANOPLÁSTICOS NO PERÍODO INTRAUTERINO	13
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 O testículo e o desenvolvimento testicular	15
1.2. Desreguladores endócrinos e DOHaD	18
1.3. Os micro/nanoplásticos e os ftalatos	20
1. OBJETIVO	24
2.1. Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Delineamento experimental	24
3.2. Justificativa da dose	26
3.3. Análise molecular – RT-qPCR	26
3.4. Análise estatística	27
1. RESULTADOS	27
4.1. Peso corporal, peso testicular e distância anogenital	27
4.2. Análise molecular por RT-qPCR	28
2. DISCUSSÃO	29
3. CONCLUSÃO	32
4. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II - Artigo “DEVELOPMENTAL EFFECTS OF INTRAUTERINE AND LACTATIONAL EXPOSURE TO NANOPLASTICS AND PHTHALATES ON RAT TESTIS”	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUCTION	42
2. MATERIAL AND METHODS	44
2.1. Chemicals	44
2.2. Animals and experimental design	45
2.3. Dose justification	47
2.4. External physical signs of the onset of puberty	48
2.5. Light microscopy and morphometric analysis	48
2.6. Evaluation of the oxidative profile	49
2.6.1. Lipoperoxidation	50
2.6.2. Superoxide dismutase activity	50
2.6.3. Catalase activity	50

2.6.4. Glutathione.....	50
2.7. Gene Expression by RT-qPCR.....	51
2.8. Plasma hormone levels	52
2.9. Statistical analysis	53
3. RESULTS	53
3.1. Body and testicular weight.....	53
3.2. Anogenital distance and prepuce separation	55
Anogenital distance (AGD) was measured and adjusted for body weight on PND1 and PND22. On PND1, an increase in AGD was observed in the T3 group compared to the CTRL group (Fig. 2a). On PND22, there was an increase in AGD in the T3 and T4 groups compared to the CTRL group (Fig. 2b). Furthermore, a delay in the occurrence of preputial separation was observed in the T3 group compared to the CTRL group (Fig. 2c).	
3.3. Analysis of apoptosis in spermatocytes in pachytene in prepuberty (PND22)	55
3.4. Histological and morphometrical analysis in adulthood (PND120)	56
3.5. Histopathological analyses (PND120).....	57
3.6. Gene expression in prepuberty (PND22)	58
3.7. Gene expression in adulthood (PND120).....	59
3.8. Analysis of the oxidative profile (PND22 and 120)	60
3.9. Plasma testosterone levels	63
4. DISCUSSION.....	63
5. CONCLUSION	68
6. REFERENCES	70
CONCLUSÃO GERAL	76
APPENDIX.....	77
APPENDIX 1: List of primers used in RT-qPCR	77
APPENDIX 2: CEUA Certificate.....	78

CAPÍTULO I - ALTERAÇÕES TESTICULARES EM FETOS MACHOS EXPOSTOS A MISTURA DE FALATOS E NANOPLÁSTICOS NO PERÍODO INTRAUTERINO

RESUMO

O desenvolvimento testicular depende de interações hormonais e celulares que regulam a diferenciação, maturação e funcionalidade da gônada. Alterações neste processo durante o período fetal podem repercutir a longo prazo na espermatogênese e na esteroidogênese. A crescente produção e utilização de plásticos tem levantado preocupações devido aos impactos ambientais e de saúde associados. No ambiente, os plásticos são degradados em micro e nanoplásticos (MNPS), partículas pequenas que tem a capacidade de adsorver compostos lipofílicos, como os ftalatos, caracterizados como desreguladores endócrinos (DEs). No entanto, os efeitos da coexposição a nanoplásticos (NPs) e ftalatos, resíduos da degradação do plástico, sobre o desenvolvimento reprodutivo masculino são poucos compreendidos. Este estudo investigou o impacto da exposição gestacional a uma mistura de ftalatos (MF) e NPs, isoladamente ou combinados, em parâmetros biométricos e de expressão gênica testicular de fetos machos descendentes. Ratas prenhes Sprague-Dawley foram distribuídas em seis grupos: controle (CTRL), T1 (20 µg/kg/dia – MF), T2 (200 mg/kg/dia – MF), T3 (1 mg/kg/dia – NPs, 100 nm), T4 (20 µg/kg/dia – MF + 1 mg/kg/dia – NPs) e T5 (200 mg/kg/dia – MF + 1 mg/kg/dia – NPs), tratadas por via oral do dia gestacional 5 ao 20. A MF utilizada neste estudo foi baseada nas concentrações dos principais metabólitos detectados na urina de gestantes, refletindo um cenário realista de exposição humana. A menor dose da MF representa uma concentração ambientalmente relevante, enquanto a maior corresponde a uma dose que extrapola a exposição diária com o intuito de comparação com trabalhos que consideram a exposição de ftalatos únicos. Já a concentração de NPs empregada foi escolhida por representar uma exposição ambientalmente relevante. Os resultados indicaram redução do peso corporal em T5 e diminuição da distância anogenital em T3. Em nível molecular, T4 apresentou aumento da expressão de *Amh*, *Insl3*, *Ar*, *Srd5a1* e *Cyp19a1*, além de elevação adicional de *Ar* em T5 e redução de *Hsd17b1* em T1. Esses achados sugerem que a coexposição gestacional a ftalatos e NPs, especialmente em T4, modula genes envolvidos na diferenciação e na via esteroidogênica, possivelmente afetando o desenvolvimento testicular fetal e indicando efeitos sinérgicos entre os contaminantes.

Palavras-chave: desenvolvimento fetal; exposição materna; ftalatos; nanoplásticos; testículo.

ABSTRACT

Testicular development depends on hormonal and cellular interactions that regulate gonadal differentiation, maturation, and functionality. Alterations in this process during the fetal period can have long-term repercussions on spermatogenesis and steroidogenesis. The increasing production and use of plastics has raised concerns due to the associated environmental and health impacts. In the environment, plastics degrade into micro- and nanoplastics (MNPs), small particles that have the ability to adsorb lipophilic compounds, such as phthalates, characterized as endocrine disruptors (EDs). However, the effects of co-exposure to nanoplastics (NPs) and phthalates, residues of plastic degradation, on male reproductive development are poorly understood. This study investigated the impact of gestational exposure to a mixture of phthalates (MF) and NPs, alone or in combination, on biometric parameters and testicular gene expression in male offspring. Pregnant Sprague-Dawley rats were divided into six groups: control (CTRL), T1 (20 µg/kg/day – MF), T2 (200 mg/kg/day – MF), T3 (1 mg/kg/day – NPs, 100 nm), T4 (20 µg/kg/day – MF + 1 mg/kg/day – NPs), and T5 (200 mg/kg/day – MF + 1 mg/kg/day – NPs), treated orally from gestational day 5 to 20. The MF used in this study was based on the concentrations of the main metabolites detected in the urine of pregnant rats, reflecting a realistic scenario of human exposure. The lowest dose of the MF represents an environmentally relevant concentration, while the highest corresponds to a dose that exceeds daily exposure for comparison with studies that consider exposure to single phthalates. The concentration of NPs used was chosen because it represents an environmentally relevant exposure. The results indicated a reduction in body weight at T5 and a decrease in anogenital distance at T3. At the molecular level, T4 showed increased expression of *Amh*, *Insl3*, *Ar*, *Srd5a1*, and *Cyp19a1*, in addition to a further increase in *Ar* at T5 and a reduction in *Hsd17b1* at T1. These findings suggest that gestational co-exposure to phthalates and NPs, especially at T4, modulates genes involved in differentiation and the steroidogenic pathway, possibly affecting fetal testicular development and indicating synergistic effects between the contaminants.

Keywords: Fetal development; maternal exposure; nanoplastics; phthalates; testis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O testículo e o desenvolvimento testicular

Os testículos, localizados no escroto, são envolvidos pela túnica albugínea, uma cápsula de tecido conjuntivo denso que projeta septos para o interior do órgão, delimitando lóbulos que abrigam os túbulos seminíferos e convergem para o mediastino testicular (Lin *et al.*, 2025). Sua função é anfícina, exercendo simultaneamente a produção de gametas e a síntese de hormônios, destacando, assim, a importância desse órgão para o desenvolvimento reprodutivo masculino e fertilidade (Li *et al.*, 2024).

Do ponto de vista morfológico, os testículos são organizados em dois compartimentos: tubular e intertubular (ou intersticial). O compartimento tubular é composto pelos túbulos seminíferos, onde se localizam as células germinativas em diferentes estágios do processo espermatogênico, bem como as células somáticas de suporte, denominadas células de Sertoli (CS). Enquanto o compartimento intersticial é composto predominantemente pelas células de Leydig (CL), células mioídes (que circundam os túbulos seminíferos), vasos sanguíneos, linfáticos, terminações nervosas e uma população de células variável constituída principalmente de macrófagos, fibroblastos e mastócitos (Heinrich; Defalco, 2019).

As CS são imprescindíveis para o desenvolvimento gonadal e sobrevivência das espermatogônias, por meio de hormônios e fatores de crescimento, como o hormônio anti-Mülleriano (AMH). O AMH promove a diferenciação sexual masculina, induzindo a regressão dos ductos paramesonéfricos e contribuem para o funcionamento adequado das gônadas. Ressalta-se a importância do AMH, visto que estudos indicam que alterações em seus níveis estão associados à patogênese dos distúrbios da diferenciação sexual e criptorquidia (Sansone *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2021).

As CS criam um microambiente para a nutrição e maturação das células germinativas, fagocitam aquelas que estão degeneradas, e transportam espermátides maduras para o lúmen dos túbulos seminíferos (Griswold, 2018). Além disso, as CS produzem moléculas de função parácrina e endócrina, como a proteína ligadora de androgênio (ABP), inibina B e o próprio AMH, que estão envolvidas na regulação da espermatogênese (Xiao *et al.*, 2025).

A barreira hematotesticular (BHT) é formada por junções especializadas entre as CS, incluindo junções oclusivas, aderentes e comunicantes (Stanton, 2016). A BHT atua de forma física ao estabelecer uma separação seletiva entre os compartimentos basal e adluminal, de forma fisiológica ao controlar o movimento de substâncias para o lúmen, e de forma imunológica ao expressar fatores imunorreguladores que conferem privilégio imunológico às

células germinativas, protegendo contra a resposta imune e a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mital; Hinton; Dufour, 2011; Kaur; Thompson; Dufour, 2014). Ademais, as CS interagem amplamente com as CL por meio de mecanismos parácrinos que vão regular o desenvolvimento e a esteroidogênese dessas células (Rebourcet *et al.*, 2014).

As CL são a principal fonte de andrógenos nos testículos, dentre os hormônios produzidos, destaca-se a testosterona, o principal hormônio sexual masculino (Smith; Walker, 2014). Esse processo é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HHG), no qual a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo estimula a adenohipófise a secretar o hormônio luteinizante (LH). O LH, por sua vez, se liga em receptores nas CL, ativando a esteroidogênese — processo no qual o colesterol é utilizado como substrato inicial para a síntese de esteroides. O transporte de colesterol do citosol para a membrana interna depende da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR). A partir disso, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima CYP11A1 e segue por uma via enzimática resultando na síntese de testosterona (Ye *et al.*, 2017).

Os andrógenos produzidos influenciam na modulação das funções das CS, promovendo a diferenciação e maturação das células germinativas na espermatogênese. Além disso, são importantes no desenvolvimento dos derivados do ducto mesonéfrico (epidídimo, ducto deferente e glândula seminal) e da genitália externa, bem como na manutenção das características sexuais secundárias masculinas (Murashima *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2024). Adicionalmente, as CL participam da descida testicular (Virtanen; Toppari, 2014), principalmente através da secreção de fatores como o peptídeo *insulin-like 3* (INSL3), além dos andrógenos (Ivell *et al.*, 2022; O'donnel; Whiley; Loveland, 2022).

Para além da estrutura e função dos testículos na vida adulta, é importante compreender sua origem durante o desenvolvimento embrionário, que estabelece as bases para a organização morfofuncional do órgão. O desenvolvimento dos testículos em mamíferos tem início na fase embrionária, quando as células progenitoras bipotenciais da gônada indiferenciada passam a expressar o gene *Sry* codificado pelo cromossomo Y, o que direciona para a linhagem testicular (Koopman *et al.*, 1990). Em ratos, esse processo ocorre aproximadamente entre o dia gestacional (DG) 12-13, quando se formam os cordões seminíferos primitivos, compostos pelos precursores das CS que circundam as células germinativas primordiais e induzem o desenvolvimento da população de células de Leydig fetais (CLF) (Magre; Jost, 1991). No DG15, as CLF se diferenciam a partir do mesênquima do interstício testicular e iniciam a secreção de testosterona e INSL3, estabelecendo a função endócrina do órgão e incitando o

desenvolvimento dos túbulos e ductos reprodutivos, bem como dos órgãos sexuais masculinos (Rebourcet *et al.*, 2014).

No período neonatal do rato, que compreende do dia pós-natal (DPN) 0 ao DPN7, ocorre a transição dos gonócitos para espermatogônias tipo A com alta taxa mitótica, acompanhada por aumento do índice proliferativo e início da maturação das CS (Huckins; Clermont, 1968; Picut *et al.*, 2014). Na fase pré-puberal (DPN 15-22), as CS secretam fluido que contribui para a formação do lúmen tubular, iniciam o estabelecimento da BHT e se tornam funcionais no final dessa fase, além de cessar a sua proliferação entre os DPNs 15-21. Enquanto isso, as CLF começam a regredir e passar por um processo de diferenciação progressiva, transitando pelas fases de células progenitoras (DPN 10-14) e células de Leydig imaturas (DPN 21-28) (Desjardins, 1978; Orth, 1982; Picut *et al.*, 2014).

Durante o período puberal (DPN 33-55), as células de Leydig adultas são finalmente estabelecidas, completando a transição. Além disso, há a consolidação da espermiogênese funcional, caracterizada pela maturação das espermátides em espermatozoides e pela presença de todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero (Ojeda; Advis; Andrews, 1980; Picut *et al.*, 2014; Stanton, 2016; Ye *et al.*, 2017). Por fim, na idade adulta (>DPN 61), há um crescimento do testículo associado ao aumento do diâmetro tubular e regularidade da espermatogênese (Picut *et al.*, 2014).

Ampliando a perspectiva para os mamíferos de modo geral, observa-se que a maturação do sistema genital masculino segue uma sequência morfológica semelhante entre as espécies. No entanto, o ser humano nasce em um estágio mais avançado de desenvolvimento em comparação ao rato recém-nascido. No que se refere ao desenvolvimento testicular, tanto em ratos quanto em humanos, ocorrem eventos fundamentais em uma mesma ordem — formação dos cordões seminíferos, diferenciação das CS e CL, transformação dos gonócitos em espermatogônias, formação da BHT e início da espermatogênese — porém com diferenças marcantes quanto à temporalidade, ao controle hormonal e ao padrão de maturação (Picut; Ziejewski; Stanislaus, 2017).

Em humanos, o testículo fetal depende das gonadotrofinas (gonadotrofina coriônica humana) e LH para sua maturação desde as fases iniciais da gestação, enquanto nos ratos o desenvolvimento testicular inicial é independente dessas gonadotrofinas, sendo mediado por fatores parácrinos, como o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1). Outra diferença importante é que, em humanos, há um período prolongado de quiescência testicular — entre os 3 e 9 anos de idade — caracterizado por baixa atividade mitótica, enquanto nos ratos essa fase está ausente, e o desenvolvimento testicular ocorre de forma contínua e

acelerada após o nascimento. Adicionalmente, eventos como a descida testicular (em condições normais) e o surgimento das espermatogônias ocorrem ainda na vida fetal em humanos, mas somente após o nascimento nos ratos, refletindo a relativa imaturidade do rato ao nascer (Picut; Ziejewski; Stanislaus, 2017).

Apesar dessas diferenças, o rato é amplamente utilizado em pesquisas toxicológicas devido ao seu custo relativamente baixo, ciclo reprodutivo curto, facilidade de manejo e disponibilidade em ambientes laboratoriais. Além disso, é amplamente reconhecido que, para avaliar os efeitos de exposições durante períodos críticos de suscetibilidade, a realização de testes *in vivo* é essencial, pois permite captar respostas hormonais integradas e alterações funcionais complexas que não podem ser adequadamente avaliadas em modelos *in vitro* (Auger *et al.*, 2014). Essas características, somadas ao vasto conhecimento acumulado sobre a anatomia, fisiologia e desenvolvimento testicular em ratos, consolidam esse animal como um modelo experimental eficaz para a detecção precoce de lesões testiculares e efeitos toxicológicos. Ainda assim, é fundamental considerar as limitações inerentes à extrapolação direta dos achados para humanos, exigindo cautela na interpretação dos resultados (Picut; Ziejewski; Stanislaus, 2017).

Ademais, é importante destacar que o desenvolvimento adequado dos testículos em mamíferos até a idade adulta depende de uma série de processos hormonais e celulares inter-relacionados, tornando o órgão altamente suscetível a perturbações, o que pode comprometer etapas críticas da diferenciação e maturação testicular, além de impactar a funcionalidade das CS e CL. Como consequência, há um aumento do risco para o surgimento de anormalidades e distúrbios reprodutivos em curto, médio e longo prazo (Li; Spade, 2021).

As perturbações podem ter origem de uma combinação de fatores genéticos, hormonais, ambientais e relacionados ao estilo de vida (Elamo; Virtanen; Toppari, 2022). Entretanto, acredita-se que os fatores ambientais estão diretamente envolvidos nas taxas crescentes desses distúrbios, sendo os desreguladores do sistema endócrino frequentemente apontados como potenciais causadores (Kilcoyne; Mitchell, 2019).

1.2. Desreguladores endócrinos e DOHaD

Os desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias ou misturas químicas, naturais ou sintéticas, que alteram o funcionamento do sistema endócrino e, consequentemente, induzem efeitos adversos em um determinado organismo ou na sua descendência (Yoon *et al.*, 2014). A ação dos DEs pode ocorrer de diversas maneiras, como ligar-se aos receptores hormonais e

mimetizar ou bloquear a ação de hormônios endógenos, como os estrógenos e andrógenos. Sua toxicidade pode interferir nos mecanismos homeostáticos hormonais normais que promovem o crescimento, a resposta imunológica e a reprodução nos tecidos e órgãos específicos (Ullah *et al.*, 2023). Essas substâncias também podem interferir no ciclo celular, nos processos apoptóticos e na regulação epigenética (Birnbaum, 2013; Skakkebaek *et al.*, 2016).

Além da exposição por contato direto com esses materiais, os DEs também são liberados no meio ambiente, e dessa forma, a exposição humana a eles pode ocorrer por meio da ingestão de alimentos contaminados, o contato com produtos químicos pela pele ou a inalação de partículas pelo sistema respiratório (Yesildemir; Celik, 2024). Como resultado, podem afetar indiretamente embriões/fetos por meio da placenta e neonatos através da amamentação. Portanto, os efeitos adversos não se limitam aos indivíduos diretamente expostos, mas também sobre seus descendentes, afetando seu desenvolvimento pré e pós-natal — períodos considerados janelas críticas e sensíveis do desenvolvimento animal (Ghassabian *et al.*, 2022).

Correlacionado a isso, surge a teoria das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (*Developmental Origins of Health and Disease* - DOHaD) proposta por Barker e colaboradores (1989). A DOHaD propõe que o ambiente no qual um indivíduo se expõe durante o desenvolvimento precoce, pode programar de forma permanente a estrutura e a função de tecidos e órgãos, alterando a susceptibilidade a doenças e distúrbios mais tarde na vida (Rosenfeld, 2015). No entanto, embora essa teoria tenha sido postulada há mais de 25 anos, ainda persistem lacunas importantes, especialmente no que se refere aos mecanismos moleculares e epigenéticos que mediam os efeitos dos DEs no sistema genital. Interações entre ambiente-célula e ambiente-genoma/epigenoma durante o desenvolvimento do sistema genital masculino e feminino continuam sendo objeto de intensa investigação. Por isso, essa linha de pesquisa é essencial para compreender como os insultos precoces podem repercutir negativamente na fertilidade e na saúde reprodutiva ao longo da vida e em gerações subsequentes.

Na literatura, estudos têm mostrado que os DEs estão associados à toxicidade reprodutiva masculina durante a exposição fetal, devido à sua ação estrogênica ou antiandrogênica, que pode desencadear alterações na diferenciação sexual (Jewett *et al.*, 2022). Entre os DEs, evidências apontam que os ftalatos, aditivos do plástico, podem ser responsáveis pela infertilidade e disfunção do testículo, tendo efeitos negativos, como a diminuição da quantidade e da qualidade do esperma, distância anogenital (DAG) reduzida, baixa produção

de testosterona, defeitos congênitos nos órgãos reprodutivos (criptorquidia e hipospádia) e entre outras anomalias que tem aumentado significativamente nas últimas décadas (Foster, 2006; Sifakis *et al.*, 2017; Joensen *et al.*, 2018; Li; Spade, 2021). (Figura 2).

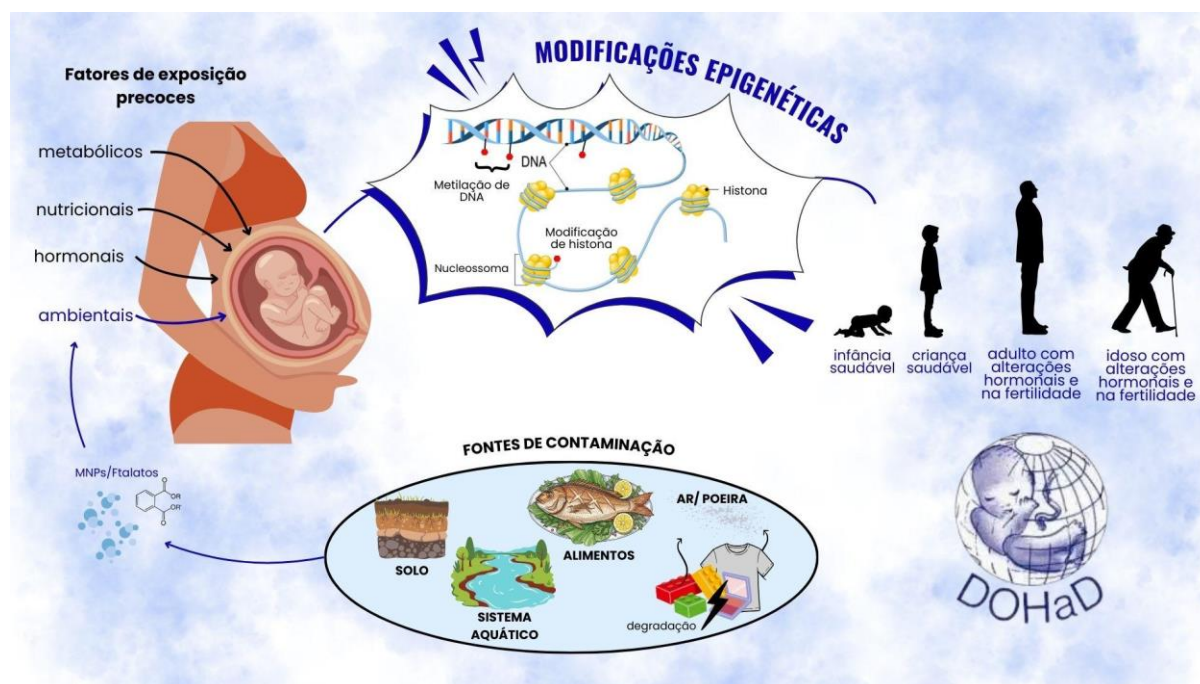


Figura 1. Esquema ilustrativo do conceito DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), demonstrando como exposições precoces durante a gestação, incluindo fatores metabólicos, nutricionais, hormonais e ambientais, como nanoplásticos e ftalatos provenientes de diferentes fontes de contaminação, podem induzir modificações epigenéticas. Essas alterações epigenéticas podem programar o desenvolvimento ao longo da vida, resultando em desfechos que variam de um desenvolvimento saudável até alterações hormonais e prejuízos na fertilidade masculina.

1.3. Os micro/nanoplásticos e os ftalatos

Devido à sua versatilidade, baixo custo e longa durabilidade, os plásticos são amplamente utilizados em uma variedade de produtos, como equipamentos médicos, brinquedos e embalagens de alimentos. Devido a esses fatores, a fabricação de materiais plásticos tem apresentado um crescimento contínuo (North; Halden, 2013; Campanale *et al.*, 2020). Em 2021, a produção mundial de plástico totalizou 390,7 milhões de toneladas (Mt), alcançando uma marca preocupante de 460 Mt em 2023 — um aumento de 17,7% em apenas dois anos (Europe, 2022; ONU, 2023). Estimativas indicam que, se mantido esse ritmo, a produção pode atingir 902 Mt até 2050 (Geyer; Jambeck; Law, 2017).

Apesar da crescente conscientização e dos avanços tecnológicos, as taxas globais de reciclagem permanecem baixas. Atualmente, apenas cerca de 9% é efetivamente reciclado em

escala global, o que se deve a uma combinação de fatores estruturais e comportamentais (OECD, 2022). Entre as principais barreiras estão a falta de infraestrutura adequada para coleta e triagem, o desconhecimento da população sobre como reciclar corretamente, o baixo incentivo econômico para o uso de material reciclado e o custo competitivo do plástico virgem. Além disso, a ausência de políticas públicas eficazes e a inconsistência regulatória entre países dificultam a implementação de sistemas de reciclagem mais eficientes (Dokl *et al.*, 2024). Contudo, o descarte inadequado resulta na sua onipresença e no acúmulo generalizado no meio ambiente, agravando significativamente a poluição por microplásticos (MPs, partículas com diâmetro <5 mm) e nanoplásticos (NPs, diâmetro < 1 μ m) (Song *et al.*, 2017; Costa, 2018). Essa problemática tem despertado a atenção da comunidade científica e da população mundial, diante das possíveis implicações que esses materiais podem ter para a saúde humana (Vethaak; Legler, 2021).

Os micro e nanoplásticos (MNPs) podem ser classificados em dois tipos: detritos plásticos primários e secundários. As partículas plásticas primárias são criadas deliberadamente em tamanhos específicos para diversos fins, como cosméticos e produtos de higiene (por exemplo, esfoliantes e pastas dentais), enquanto os detritos secundários se formam por degradação no ambiente ou durante o uso por abrasão mecânica (Hartmann *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019; Villacorta *et al.*, 2022). Com isso, os MNPs podem variar em tamanho, forma, tipos de polímeros e composições químicas, influenciando no seu transporte e distribuição no ambiente e dentro de organismos (Jaikumar *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020).

Em humanos a exposição aos MNPs ocorre principalmente por ingestão e inalação (Cox *et al.*, 2019; Prata *et al.*, 2020). Recentemente, foi comprovada a presença dessas partículas em seres humanos, tendo sido detectados no sangue e em diferentes órgãos (Amato-lourenço *et al.*, 2021; Ragusa *et al.*, 2021; Jenner *et al.*, 2022; Leslie *et al.*, 2022). Em 2025, um estudo brasileiro identificou 110 partículas de MNPs em amostras placentárias humanas provenientes de 10 gestantes, sendo essas partículas compostas principalmente de polietileno, usado na fabricação de embalagens, e por poliamida, presente em tecidos sintéticos (Oliveira *et al.*, 2025). Esse achado evidencia a capacidade dessas partículas de transpor a barreira placentária, que penetram por meio de mecanismos de transporte ativo e passivo, e reforça a preocupação quanto à toxicidade dos MNPs durante a gravidez, uma vez que o feto pode ser exposto ainda no útero, período em que há maior vulnerabilidade (Tetro *et al.*, 2018; Arumugasaamy *et al.*, 2019).

Além disso, embora a BHT atue como uma defesa para impedir a entrada de agentes citotóxicos no tecido reprodutivo masculino, estudos em ratos e camundongos demonstram que

os MNPs também são capazes de penetrar nos testículos, por meio de endocitose ou absorção, dessa forma, a saúde reprodutiva pode ser afetada tanto diretamente no indivíduo quanto em suas futuras gerações (Wright; Kelly, 2017; Amereh *et al.*, 2020; Jin *et al.*, 2020).

Com base nisso, um estudo conduzido por Amereh e colaboradores (2020) utilizou nanoplasticos com aproximadamente 40 nm em doses variando de 1 a 10 mg/kg/dia para avaliar a sua possível toxicidade reprodutiva e perturbação endócrina. Como resultado, foram identificadas alterações no sistema genital de ratos machos, incluindo redução nos níveis de hormônios como testosterona, LH e hormônio folículo-estimulante (FSH), danos no DNA, alterações na morfologia e viabilidade dos espermatozoides, além de alterações histológicas nos testículos e na expressão de genes associados à espermatogênese e na sinalização HHG, evidenciando que a exposição a partículas de plástico está associada a consequências adversas em mamíferos (Amereh *et al.*, 2020).

Além da toxicidade intrínseca dos MNPs, destaca-se a presença dos ftalatos, substâncias que conferem flexibilidade, brilho e transparência aos plásticos, tornando-os mais atrativos para o mercado e para o consumidor final (Luis *et al.*, 2021). Entretanto, por não estarem covalentemente ligados à estrutura polimérica, essas substâncias conseguem migrar para alimentos, bebidas e outros materiais (Cao, 2009). Consequentemente, os ftalatos têm sido detectados em diversos fluidos biológicos, incluindo o líquido amniótico, o leite e a urina materna (Katsikantami *et al.* 2020; Liu *et al.*, 2024).

Categorizados como desreguladores endócrinos, sabe-se que esses plastificantes podem perturbar o desenvolvimento do sistema genital e a sua fertilidade (Li; Spade, 2021). Em ratos, a exposição pré-natal ao ftalato bis(2-etilhexil)ftalato (DEHP) reduziu os níveis séricos de testosterona e estradiol na prole masculina no DPN60, além de diminuir a expressão gênica de alvos relacionados a esteroidogênese (*StAr*, *Cyp11a1*, *3β-hsd*, *17β-hsd*, *5α-redutase* e *aromatase-Cyp19*) de modo dose-dependente (Sekaran; Jagadeesan, 2015). Também foi documentado que diferentes doses de di-n-butila (DBP) administradas a ratas prenhes resultou em toxicidade no desenvolvimento e na reprodução da prole masculina, incluindo a diminuição da DAG, dano histológico dos testículos e a apoptose celular nos túbulos seminíferos (Ma *et al.*, 2017).

Outro efeito decorrente do ftalato é a indução de estresse oxidativo nos testículos. Essa condição compromete a espermatogênese, levando à apoptose das células germinativas e das CS, além de prejudicar a função das CL, reduzindo os níveis de enzimas esteroidogênicas (Sedha; Kumar; Shukla, 2015). O mesmo mecanismo também foi elucidado recentemente em um estudo realizado com células imaturas de Leydig (TM3) e Sertoli (TM4) de camundongos,

318 expostas ao mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP), o qual demonstrou lesão por estresse oxidativo
319 e a subsequente promoção de apoptose nesses tipos celulares (Wang *et al.*, 2024).

320 Ademais, cabe ressaltar que os efeitos adversos dos ftalatos vão depender de uma série
321 de condições, como o tipo, fase de desenvolvimento no momento da exposição e dosagem
322 (Svechnikov *et al.*, 2010). Além disso, a associação entre MNPs e substâncias químicas
323 dispersas no meio ambiente, incluindo ftalatos, intensifica os efeitos dessas substâncias, devido
324 às suas interações com as partículas em diferentes organismos (Deng *et al.*, 2018).

325 Os estudos toxicológicos acerca desse assunto frequentemente estão voltados para a
326 avaliação dos efeitos dos ftalatos individualmente. No entanto, é fundamental reconhecer que
327 tanto seres humanos quanto animais são expostos a uma mistura de diferentes ftalatos
328 (Ferguson *et al.*, 2014; Watkins *et al.*, 2014). Em Illinois, nos Estados Unidos, um estudo
329 avaliou as concentrações de seis principais metabólitos de ftalatos na urina de mulheres
330 grávidas, visando determinar as proporções relativas de diferentes ftalatos aos quais os fetos
331 estavam expostos indiretamente durante a gestação, esses metabólitos incluíram DEHP, DEP
332 (dietilftalato), DBP, DiBP (ftalato de diisobutil), BBzP (ftalato de benzila butila), e DiNP
333 (ftalato de diisononila) (Zhou; Gao; Flaws, 2017).

334 Os dados obtidos por esse grupo de estudo proporcionaram uma representação mais
335 precisa da exposição dos fetos aos ftalatos, uma vez que espelham as situações reais de
336 exposição encontradas na vida cotidiana, fornecendo, portanto, informações sobre a
337 composição da exposição durante o período gestacional e direcionando pesquisas futuras e
338 medidas preventivas relacionadas a esses desreguladores endócrinos.

339 Nesse contexto, apesar da relevância dos estudos toxicológicos sobre a exposição
340 fetal/perinatal aos MNPS e seus resíduos, que representam um desafio para a saúde pública
341 tanto pela sua toxicidade quanto pela sua ampla dispersão, não há dados na literatura que
342 avaliem os efeitos da exposição gestacional a uma combinação de ftalatos e nanoplásticos, em
343 doses ambientalmente relevantes, nos testículos de ratos. Além disso, considerando que as CL
344 e CS são imprescindíveis para o funcionamento adequado dos testículos e da espermatogênese,
345 o presente estudo investigou a hipótese de que a combinação de resíduos plásticos possa
346 impactar as funções dessas células e, consequentemente, prejudicar o desenvolvimento do
347 testículo e suas funções.

1. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos que a exposição materna à uma mistura de ftalatos e nanoplasticos de poliestireno (tanto isoladamente quanto em conjunto), no período gestacional, promove no desenvolvimento testicular fetal da prole de ratos.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar parâmetros biométricos e de diferenciação sexual
- Avaliar parâmetros moleculares da expressão de genes-chave na diferenciação testicular, especialmente os relacionados ao desenvolvimento e maturação das células de Leydig e Sertoli e genes relacionados às vias esteroidogênicas, associadas à conversão da testosterona, di-hidrotestosterona e estradiol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Machos adultos da linhagem Sprague Dawley (n=15), com 120 dias de idade, pesando aproximadamente 300g e fêmeas adultas (n=50), no DPN 120, pesando aproximadamente 300g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do IBB/UNESP, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23-25°C) e receberam água filtrada e ração para roedores à vontade. Após o período de aclimação dos animais, eles foram separados para o acasalamento, que foi realizado durante o período escuro do ciclo, colocando-se de duas a três fêmeas na caixa do macho, e o DG 0 foi determinado pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro e pelo acompanhamento da progressão de peso da fêmea.

As ratas prenhes foram divididas aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=7-10/grupo): C: (controle; óleo de milho/água); T1: 20 µg/kg/dia da mistura de ftalatos (MF) diluídos em óleo de milho; T2: 200 mg/kg/dia da MF diluídos em óleo de milho; T3: nanoesferas de poliestireno (NPs) de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg/dia diluído em água destilada; T4: 20µg/kg/dia da MF + NPs de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg; T5: 200mg/kg/dia da MF + NPs de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg. Os animais dos grupos

T1, T2, T4 e T5 receberam as respectivas doses da mistura na seguinte proporção: 21% DEHP, 35% DEP, 15% DBP, 8% DiBP, 5% BBzP, e 15% DiNP. A proporção da mistura se baseia na composição de ftalatos detectados em amostras de urina de mulheres grávidas em Illinois, EUA (Zhou; Gao; Flaws, 2017) e as concentrações da mistura se basearam em estudos anteriores (Zhou, Gao, Flaws, 2017; Scarano *et al.*, 2019; Aquino *et al.*, 2023), com base na concentração de DEHP (ftalato mais abundante) observada no meio ambiente (20µg/kg/dia) e em trabalhos utilizando altas doses de exposição (200mg/kg/dia) para fim de comparação.

Durante o período de exposição, as ratas prenhes, mantidas em gaiolas individuais, foram pesadas em dias alternados para calcular o volume da mistura e dos NPs a ser administrado. As ratas prenhes receberam tratamento por via oral do DG5 ao DG 20. O período de tratamento foi definido de modo a anteceder a implantação e abranger a janela crítica para o desenvolvimento do aparelho urogenital, especialmente as gônadas, ductos e a próstata (Vilamaior; Taboga; Carvalho, 2006; Prins; Putz, 2008). Foram investigados sinais clínicos de toxicidade (peso corporal, diarreia, piloereção, sangramento, respiração anormal, tremores, convulsões e mudança de marcha, postura e reação à manipulação).

No DG20, as ratas foram eutanasiadas e submetidas à laparotomia. A medida da distância anogenital foi aferida nos fetos machos e os testículos de um feto por ninhada foram coletados. A distância anogenital ajustada pelo peso corporal foi calculada conforme descrito por Gallavan *et al.* (1999). Os órgãos foram pesados e destinados às análises voltadas à avaliação da diferenciação gonadal e da via esteroidegênica por expressão gênica. O delineamento experimental está representado na Figura 3.

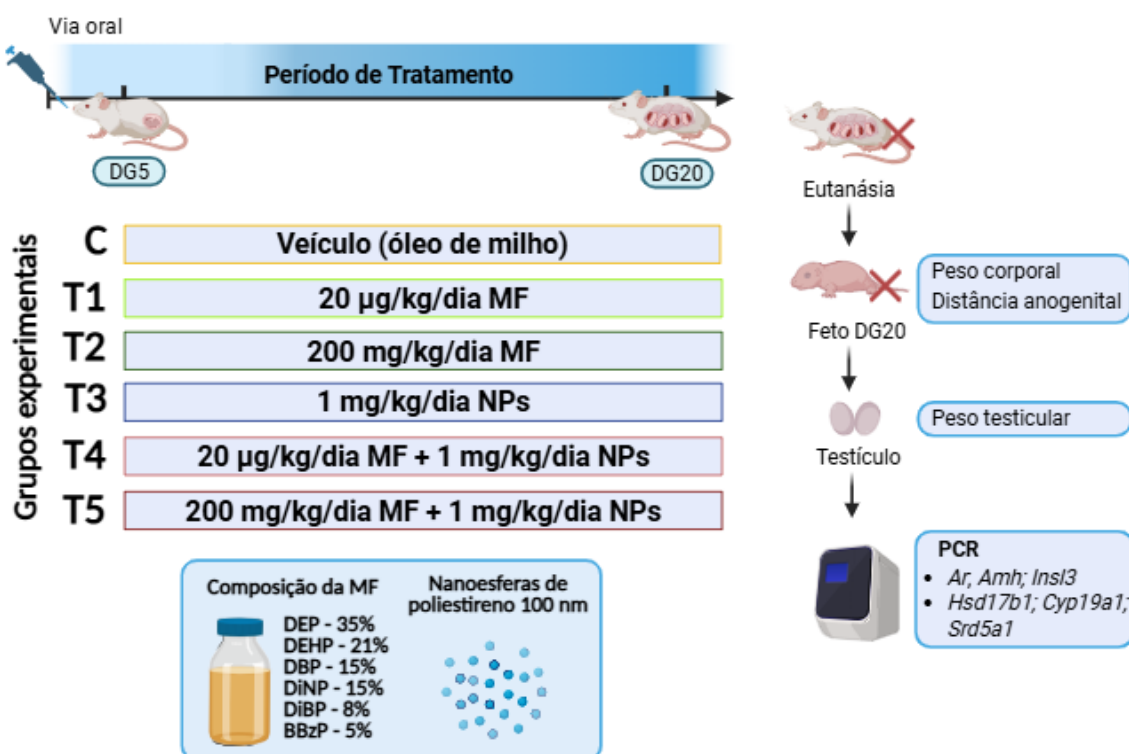


Figura 2. Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas, as análises e a composição da mistura de ftalatos (MF). Imagem criada em BioRender.com.

3.2. Justificativa da dose

No contexto dos ftalatos, a menor dose da mistura de ftalatos utilizada (20 µg/kg/dia), possui cerca de 4 µg/kg/dia de DEHP, se aproximando da exposição humana diária estimada da população ao DEHP que é de 5,7 a 42,1 µg/kg/dia (Serrano *et al.*, 2014). Além disso, as quantidades de ftalatos no ambiente geral influenciam os alimentos, a água e a poeira doméstica, amostras coletadas em vários locais mostraram concentrações de ftalatos no ar variando de 0,005 a 28,0 µg/m³ (Mohan *et al.*, 2023). Já a dose mais elevada (200 mg/kg/dia) possui cerca de 100 mg/kg/dia de DEHP, extrapolando a exposição diária com o intuito de comparação com as doses dos principais trabalhos que consideram a exposição de ftalatos únicos (Freitas *et al.*, 2021; Scarano *et al.*, 2019; Zhou; Gao; Flaws, 2017).

A dose escolhida para as nanoesferas de poliestireno (NPs - 100nm) foi de 1mg/kg/dia a fim de avaliar a concentração ambientalmente relevante de nanoplásticos não atingindo níveis deletérios de toxicidade (Yong; Valiyaveetil; Tang, 2020).

3.3. Análise molecular – RT-qPCR

Após a eutanásia, os testículos coletados dos fetos foram armazenados a -80°C até o momento da análise. Ressalta-se que ambos os testículos (direito e esquerdo) foram

destinados exclusivamente às análises moleculares, a fim de garantir quantidade suficiente de tecido para a extração de RNA. A extração do RNA (n = 6 animais/grupo) foi realizada com o kit TriZol (Ambion, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação e a pureza do material foram verificadas por espectrofotometria em um NanoVue™ Plus (GE HealthCare Life Sciences, Estados Unidos). A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os primers foram desenhados através do software Primer Express® (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de sequências publicadas no GenBank (www.pubmed.com), e sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). A termociclagem foi executada no equipamento QuantStudio (Life Technologies, EUA).

As reações para cada gene foram elaboradas em duplicatas, e para cada amostra foi plotado um gráfico de amplificação. A quantificação relativa de cada gene foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, de acordo com Livak e Schmittgen, (2001). Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre os genes alvo e o gene endógeno (*Gapdh*). Os alvos de interesse foram *Ar*, *Amh*, *Ins3* (diferenciação e desenvolvimento das células de Sertoli e Leydig), *Hsd17b1*, *Srd5a1*, *Cyp19a1* (esteroidogênese testicular) (Anexo 1).

3.4. Análise estatística

Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ SD ou mediana, seguido do intervalo interquartil q1-q3. Os dados foram analisados por ANOVA quando paramétricos, seguido pelo teste de Tukey ou Kruskal-Wallis quando não paramétricos, seguido pelo teste de Dunn. A diferença estatística foi considerada significativa quando $P \leq 0,05$. Para essas análises foi utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

1. RESULTADOS

4.1. Peso corporal, peso testicular e distância anogenital

Durante o experimento, as ratas prenhes de todos os grupos permaneceram saudáveis e ativas até a eutanásia para a coleta dos fetos, exibindo comportamento alimentar normal e sem sinais de toxicidade sistêmica. Na avaliação biométrica fetal, observou-se redução significativa do peso corporal no grupo T5 em comparação ao grupo T3 (Tabela 1). O peso testicular absoluto e relativo ao peso corporal não diferiram significativamente (Tabela 1). A distância anogenital absoluta não apresentou diferenças significativas, entretanto, quando ajustada pelo peso corporal, observou-se diminuição em T3 em comparação ao grupo T4 (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da exposição aos poluentes plásticos no peso corporal (n = 8–10/grupo), peso testicular absoluto (n = 7–8/grupo), peso testicular relativo (n = 7–8/grupo) e na distância anogenital absoluta (n = 8–10/grupo) e ajustada (n = 8–10/grupo) em descendentes no período fetal. Os dados foram analisados por ANOVA quando paramétricos, seguido pelo teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis quando não paramétricos, seguido pelo teste de Dunn e os valores foram expressos como média ± DP; e significativos quando *P ≤ 0,05.

Parâmetros	Grupos Experimentais					
	CTRL	T1	T2	T3	T4	T5
Peso corporal (g)	4,112 ± 0,48	4,208 ± 0,30	4,116 ± 0,49	4,376 ± 0,52	4,086 ± 0,30	3,869 ± 0,29 *T3
Peso testicular absoluto (mg)	1,92 ± 0,430	2,02 ± 0,599	1,88 ± 0,172	2,13 ± 0,645	1,80 ± 0,294	1,68 ± 0,501
Peso testicular relativo (mg)	0,472 ± 0,110	0,483 ± 0,125	0,471 ± 0,093	0,495 ± 0,168	0,441 ± 0,072	0,387 ± 0,197
DAG absoluta (cm)	3,468 ± 0,19	3,246 ± 0,27	3,430 ± 0,37	3,196 ± 0,24	3,503 ± 0,27	3,293 ± 0,49
DAG ajustada (cm)	2,171 ± 0,15	2,011 ± 0,16	2,149 ± 0,27	1,957 ± 0,13 *T4	2,194 ± 0,18	2,110 ± 0,32

4.2. Análise molecular por RT-qPCR

A expressão de mRNA de genes associados ao desenvolvimento e à maturação testicular apresentou aumento do *Amh* no grupo T4 em comparação aos grupos T1 e T3 (Fig. 4 a), enquanto a *Ins13* apresentou elevação no grupo T4 em relação ao T1 (Fig. 4 b). A expressão do *Ar* foi maior nos grupos T4 e T5 quando comparados ao T3 (Fig. 4 c). Nos genes relacionados à via esteroidogênica, observou-se redução da expressão de *Hsd17b1* no grupo T1 em relação ao CTRL, enquanto o grupo T4 apresentou aumento em relação tanto ao CTRL quanto ao T3 (Fig. 4 d). Para *Srd5a1*, o grupo T4 exibiu níveis mais elevados em comparação ao CTRL e ao T1 (Fig. 4 e). Por fim, a expressão de *Cyp19a1* foi maior no grupo T4 em relação aos grupos T1 e T3 (Fig. 4 f).

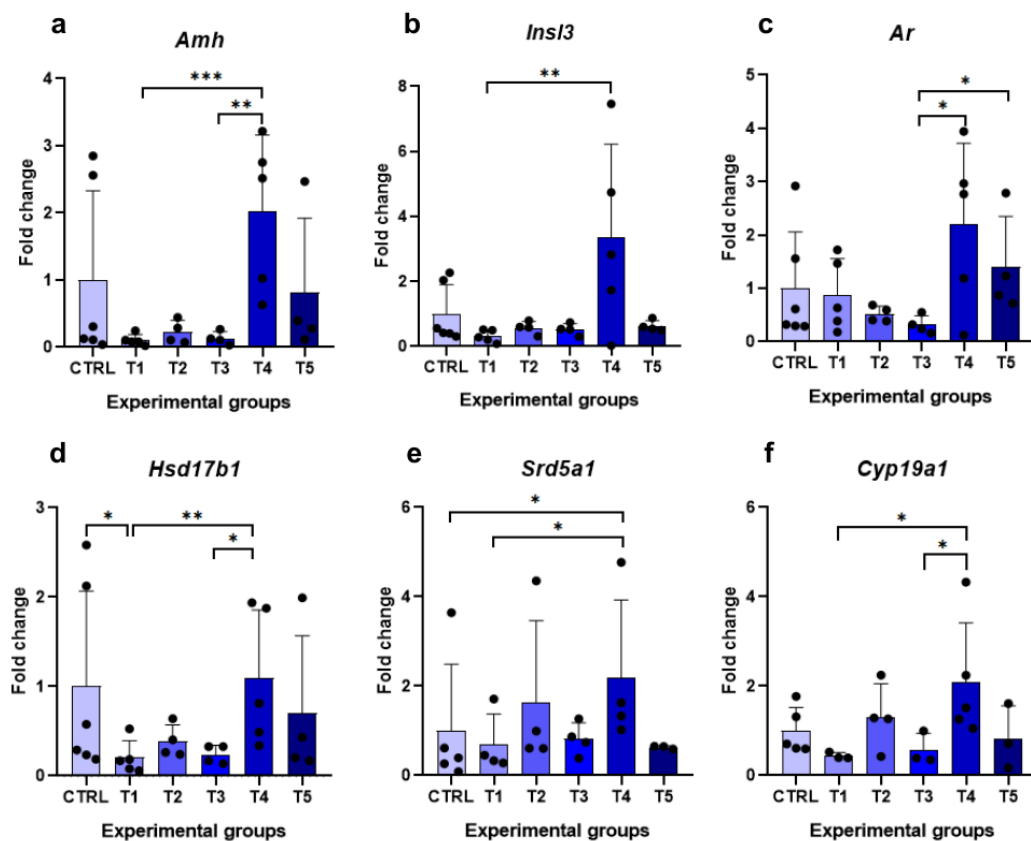


Figura 3. Efeito da exposição gestacional à uma mistura de ftalatos e nanoplástico em ratos descendentes no DG 20 sobre os níveis relativos de mRNA em genes do desenvolvimento e maturação testicular e em genes da via esteroidogênica. **(a)** Hormônio anti-mulleriano (Amh). **(b)** Insulina-3 (Ins13) **(c)** Receptor de andrógeno (Ar). **(d)** 17-beta desidrogenase 1 (Hsd17b1). **(e)** Steroid 5 alpha-reductase 1 (Srd5a1). **(f)** Aromatase (Cyp19a1). A expressão gênica é dada pela quantificação de $2^{\Delta\Delta CT}$ e os dados foram analisados por ANOVA quando paramétricos, seguido pelo teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis quando não paramétricos, seguido pelo teste de Dunn e os valores foram expressos como média $\pm$ DP; n = 4-6/grupo e significativos quando $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$.

2. DISCUSSÃO

Este estudo apresenta caráter inovador ao investigar, de forma integrada, os efeitos da coexposição gestacional a ftalatos e nanoplásticos sobre parâmetros testiculares biométricos e moleculares ainda na fase fetal. Os resultados revelaram alterações relevantes, como a redução do peso corporal e diminuição da distância anogenital (DAG), bem como o aumento da expressão de genes importantes para o desenvolvimento, maturação e esteroidogênese testicular.

Na avaliação biométrica, observou-se redução significativa do peso corporal em T5 em comparação ao grupo T3, sem alterações no peso testicular absoluto ou relativo. De forma

semelhante, um estudo que expôs camundongos do DPN 67 ao 157 (fase adulta) a 0,125, 0,5 e 2 mg/dia de microplásticos de poliestireno também relatou diminuição do peso corporal (Park *et al.*, 2020). Em contraste, ratas expostas a 100 e 750 mg/kg de DEHP durante a gestação apresentaram descendentes no DG21 com o peso corporal fetal inalterado, além da redução do peso testicular relacionado ao aumento na formação de aglomerados de células de Leydig fetais e diminuição no número e no volume dessas células (Lin *et al.*, 2008). Em conjunto, esses achados sugerem que a associação entre ftalatos e nanoplásticos pode ter promovido um efeito sistêmico, afetando o crescimento corporal dos descendentes sem repercussão direta sobre o peso testicular. Além disso, a exposição à mistura de ftalatos pode ter contribuído para esse desfecho, uma vez que estudos com ftalatos isolados nem sempre demonstram o mesmo padrão de alteração nesses parâmetros.

Neste estudo, não houveram alterações significativas da DAG absoluta entre os grupos, enquanto a DAG ajustada diminuiu em T3 em relação a T4. Ainda, considerando um $p=0,058$, houve uma redução limítrofe de T3 em relação ao grupo controle. Os efeitos sobre a DAG são extensivamente estudados nos estudos envolvendo os ftalatos. Por exemplo, fetos machos de ratas expostas a 1,0% e 2,0% de DBP entre os dias gestacionais 11 e 21 apresentaram redução significativa da DAG absoluta e relativa (Ema; Miyawaki; Kawashima, 1998). De forma semelhante, a exposição perinatal ao DEHP (750 mg/kg, DG 2–20) resultou não apenas em diminuição da DAG, mas também em redução expressiva da síntese de testosterona fetal (Lin *et al.*, 2008). Até o momento, não há relatos consistentes na literatura demonstrando diminuição da DAG em descendentes fetais expostos exclusivamente a nanoplásticos. Assim, embora a concentração sérica de testosterona não tenha sido avaliada neste estudo (nessa idade), a tendência observada no grupo exposto apenas ao nanoplástico (T3) sugere que essa exposição isolada pode potencialmente impactar a distância anogenital.

A diferenciação sexual masculina depende da produção adequada de testosterona pelo testículo fetal, no qual desajustes na regulação da esteroidogênese ocasionados por exposições ambientais podem prejudicar os níveis de andrógenos e estrógenos em um período crítico do desenvolvimento (Scott; Mason; Sharpe, 2009). Neste estudo, foram analisados genes envolvidos na etapa final da esteroidogênese, responsáveis pela formação da testosterona e de hormônios derivados. A enzima codificada por *Hsd17b1* converte estrona em estradiol, mas também androstenediona em testosterona. A androstenediona pode ser transformada em estrona e a testosterona em estradiol pela *Cyp19a1* (aromatase). Já a testosterona pode ser convertida em diidrotestosterona (DHT) pela *Srd5a1*, sendo que a DHT apresenta afinidade até dez vezes maior pelo receptor androgênico em comparação à própria testosterona, uma das

explicações do seu efeito biológico mais potente (Azzouni *et al.*, 2012; Chakraborty; Pramanik; Mahata, 2021; Lawrence *et al.*, 2022).

Os resultados moleculares demonstraram aumento da expressão em T4 dos genes *Hsd17b1* (comparado ao T1 e T3), *Cyp19a1* (comparado ao T1 e T3) e *Srd5a1* (comparado ao CTRL e T1). Além disso, foi observado redução de *Hsd17b1* no grupo T1 em relação ao controle. Em concordância, fetos expostos a 750 mg/kg de DEHP durante a gestação também apresentaram aumento na expressão de *Srd5a1*, entretanto a *Cyp19* mostrou-se reduzida na dose de 100 mg/kg, ambos resultados em relação ao controle (Lin *et al.*, 2008). Além disso, no mesmo estudo a expressão de *Hsd17b3* permaneceu inalterada nas diferentes concentrações de DEHP avaliadas (Lin *et al.*, 2008). O aumento conjunto desses genes na coexposição sugere maior atividade da via esteroidogênica, favorecendo tanto a síntese de estrógenos (via *Hsd17b1* e *Cyp19a1*), quanto de DHT (via *Srd5a1*).

Ademais, foram avaliados genes relacionados ao desenvolvimento e maturação testicular. No grupo T4, verificou-se aumento na expressão de *Insl3* (comparado ao T1), de *Amh* (comparado ao T1 e T3), além de aumento na expressão de *Ar* em T4 e T5 em relação ao grupo T3. Durante o desenvolvimento, as CLF produzem o hormônio *Insl3*, que em conjunto com os andrógenos, induz a descida testicular; e sua inativação pode resultar em desenvolvimento gubernacular alterado, disfunção testicular e criptorquidia (Wilson *et al.*, 2004). O gene *Amh*, por sua vez, é expresso nas CS e promove a regressão dos ductos de Müller, sendo sua transcrição modulada pela sinalização do receptor androgênico (Edelsztein *et al.*, 2022; An *et al.*, 2023). Os resultados aqui observados contrastam parcialmente com a literatura quando comparamos nosso modelo aos modelos de exposição utilizando ftalatos isolados. Hannas *et al.* (2011) mostraram redução na expressão da *Insl3* em ratos no DG18 após a exposição gestacional do dia 14 ao 18 ao DEHP em concentrações de 600, 800 e 1000 mg/kg/dia, de maneira dose dependente. Adicionalmente, observou-se redução na expressão de *Amh* e *Ar* em camundongos no DPN 15 expostos na gestação e na amamentação a doses de 1 e 10 mg/kg/dia de bisfenol A e ao DEHP (Xi *et al.*, 2012). O aumento de expressão de *Ar* em T4 e T5 em relação a T3, pode ter relação a um mecanismo compensatório relacionado à atividade antiandrogênica de alguns ftalatos da mistura, especialmente na fase de diferenciação gonadal, que em combinação com os nanoplásticos podem ser potencializados, visto que não houve alteração deste receptor nos grupos tratados somente com a mistura.

Ressalta-se que análises adicionais são necessárias para elucidar esses achados, uma vez que o aumento da expressão de mRNA não garante, necessariamente, maior produção ou atividade funcional da proteína correspondente.

3. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a coexposição gestacional a ftalatos e nanoplásticos pode modular de forma não linear, ou seja, não dependente da dose, genes relacionados a esteroidogênese e ao desenvolvimento testicular. Estudos futuros devem integrar análises hormonais séricas e proteômicas para confirmar se a superexpressão gênica observada de fato se traduz em maior atividade funcional, além de avaliar as repercussões reprodutivas durante o desenvolvimento pós-natal.

4. REFERÊNCIAS

- AMATO-LOURENÇO, L. F. *et al.* Presence of airborne microplastics in human lung tissue. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 416, p. 126124, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126124>.
- AMEREH, F. The emerging risk of exposure to nano(micro)plastics on endocrine disturbance and reproductive toxicity: from a hypothetical scenario to a global public health challenge. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114158, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114158>.
- AN, K. *et al.* Potential Role of Anti-Müllerian Hormone in Regulating Seasonal Reproduction in Animals: The Example of Males. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5874, jan. 2023.
- AQUINO, A. M. *et al.* Integrated transcriptome and proteome analysis indicates potential biomarkers of prostate cancer in offspring of pregnant rats exposed to a phthalate mixture during gestation and lactation. **Chemosphere**, v. 341, p. 140020, nov. 2023.
- ARUMUGASAAMY, N. *et al.* Microphysiological systems of the placental barrier. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 161-162, p. 161-175, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2020.08.010>
- AUGER, J. *et al.* Integrative rodent models for assessing male reproductive toxicity of environmental endocrine active substances. **Asian Journal Of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 60, 2014. <http://dx.doi.org/10.4103/1008-682x.122366>.
- AZZOUNI, F. *et al.* The 5 Alpha-Reductase Isozyme Family: A Review of Basic Biology and Their Role in Human Diseases. **Advances in Urology**, v. 2012, p. 530121, 2012.
- BARKER, D.J.P I *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577-580, 1989. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90710-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90710-1).
- BIRNBAUM, L. S. State of the Science of Endocrine Disruptors. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 4, 2013. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1306695>.
- CAMPANALE, C *et al.* A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. **International Journal Of Environmental**

597 **Research And Public Health**, v. 17, n. 4, p. 1212, 2020.
598 <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17041212>.

599 CAO, X. Phthalate Esters in Foods: sources, occurrence, and analytical methods.
600 **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 21-43, 2009.
601 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00093.x>.

602 CHAKRABORTY, S.; PRAMANIK, J.; MAHATA, B. Revisiting steroidogenesis and its
603 role in immune regulation with the advanced tools and technologies. **Genes & Immunity**, v.
604 22, n. 3, p. 125–140, jul. 2021.

605 COSTA, J. P. Micro- and nanoplastics in the environment: research and policymaking.
606 **Current Opinion In Environmental Science & Health**, v. 1, p. 12-16, 2018.
607 <http://dx.doi.org/10.1016/j.coesh.2017.11.002>.

608 COX, K. D. *et al.* Human Consumption of Microplastics. **Environmental Science &**
609 **Technology**, v. 53, n. 12, p. 7068-7074, 2019.
610 <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.9b01517>.

611 DENG, Y. *et al.* Evidence that microplastics aggravate the toxicity of organophosphorus
612 flame retardants in mice (*Mus musculus*). **Journal Of Hazardous Materials**, v. 357, p.
613 348-354, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.06.017>.

614 DESJARDINS C. Endocrine regulation of reproductive development and function in the
615 male. **J Anim Sci.** 1978;47 Suppl 2:56-79. PMID: 122449.

616 DOKL, M. *et al.* Global projections of plastic use, end-of-life fate and potential changes in
617 consumption, reduction, recycling and replacement with bioplastics to 2050. **Sustainable**
618 **Production And Consumption**, v. 51, p. 498-518, 2024.
619 <http://dx.doi.org/10.1016/j.spc.2024.09.025>.

620 EDELSZTEIN, N. Y. *et al.* AMH Regulation by Steroids in the Mammalian Testis:
621 oliveiraUnderlying Mechanisms and Clinical Implications. **Frontiers in Endocrinology**,
622 v. 13, 31 maio 2022.

623 ELAMO, H. P.; VIRTANEN, H. E.; TOPPARI, J. Genetics of cryptorchidism and
624 testicular regression. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**,
625 v. 36, n. 1, p. 101619, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2022.101619>.

626 EMA, M.; MIYAWAKI, E.; KAWASHIMA, K. Further evaluation of developmental
627 toxicity of di-n-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats.
628 **Toxicology Letters**, v. 98, n. 1-2, p. 87–93, set. 1998.

629 EUROPE, P. Plastics – the Facts 2022. **Plastic Europe**, n. October, p. 1–81, 2022

630 FERGUSON, K. K. *et al.* Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation
631 to sex hormones and puberty in boys. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 70-76, 2014.
632 <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.06.002>.

633 FOSTER, P. M.D. Disruption of reproductive development in male rat offspring
634 following in utero exposure to phthalate esters. **International Journal Of Andrology**, v.
635 29, n. 1, p. 140-147, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00563.x>.

636 FRANÇA, L. R. *et al.* The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity.
 637 **Andrology**, v. 4, n. 2, p. 189-212, 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/andr.12165>.

638 FREITAS, T. *et al.* Prenatal exposure to a mixture of different phthalates increases the risk
 639 of mammary carcinogenesis in F1 female offspring. **Food And Chemical Toxicology**, v.
 640 156, p. 112519, out. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2021.112519>.

641 GALLAVAN, R. H. *et al.* Interpreting the toxicologic significance of alterations in
 642 anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body
 643 weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.

644 GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. Production, use, and fate of all plastics ever
 645 made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, 2017. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.1700782>.

646 GHASSABIAN, A. *et al.* Endocrine-Disrupting Chemicals and Child Health. **Annual**
 647 **Review Of Pharmacology And Toxicology**, v. 62, n. 1, p. 573-594, 2022.
 648 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-021921-093352>.

649 GRISWOLD, M. D. 50 years of spermatogenesis: sertoli cells and their interactions with
 650 germ cells. **Biology Of Reproduction**, v. 99, n. 1, p. 87-100, 2018.
 651 <http://dx.doi.org/10.1093/biolre/ioy027>.

652 HANNAS, B. R. *et al.* Dose-Response Assessment of Fetal Testosterone Production and
 653 Gene Expression Levels in Rat Testes Following InUtero Exposure to Diethylhexyl
 654 Phthalate, Diisobutyl Phthalate, Diisoheptyl Phthalate, and Diisononyl Phthalate.
 655 **Toxicological Sciences**, v. 123, n. 1, p. 206-216, 2011.
 656 <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr146>.

657 HARTMANN, N. B. *et al.* Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a
 658 Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. **Environmental Science &**
 659 **Technology**, v. 53, n. 3, p. 1039-1047, 2019. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.8b05297>

660 HEINRICH, A.; DEFALCO, T.. Essential roles of interstitial cells in testicular development
 661 and function. **Andrology**, v. 8, n. 4, p. 903-914, 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/andr.12703>.

662 HUCKINS C.; CLERMONT Y. Evolution of gonocytes in the rat testis during late
 663 embryonic and early post-natal life. **Arch Anat Histol Embryol**. 1968;51(1):341-54. PMID:
 664 4905275.

665 IVELL, R. *et al.* Expression and Role of INSL3 in the Fetal Testis. **Frontiers In**
 666 **Endocrinology**, v. 13, p. 00-00, 2022. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.868313>.

667 JAIKUMAR, G. Reproductive toxicity of primary and secondary microplastics to three
 668 cladocerans during chronic exposure. **Environmental Pollution**, v. 249, p. 638-646, 2019.
 669 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.085>.

670 JENNER, L. C. Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR
 671 spectroscopy. **Science Of The Total Environment**, v. 831, p. 154907, 2022.
 672 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154907>.

673 JEWETT, E. *et al.* Microplastics and Their Impact on Reproduction—Can we Learn From
 674 the C. elegans Model? **Frontiers In Toxicology**, v. 4, 2022.
 675 <http://dx.doi.org/10.3389/ftox.2022.748912>.

676 JIN, H. *et al.* Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice.
 677 **Journal Of Hazardous Materials**, v. 401, p. 123430, 2021.
 678 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123430>.

679 JOENSEN, U. N. *et al.* Urinary excretion of phenols, parabens and benzophenones in
 680 young men: associations to reproductive hormones and semen quality are modified by
 681 mutations in the filaggrin gene. **Environment International**, v. 121, p. 365-374, 2018.
 682 10.1016/j.envint.2018.09.020

683 KATSIKANTAMI, I. *et al.* Phthalate metabolites concentrations in amniotic fluid and
 684 maternal urine: cumulative exposure and risk assessment. **Toxicology Reports**, v. 7, p.
 685 529-538, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.04.008>.

686 KAUR, G.; THOMPSON, L. A.; DUFOUR, J. M.. Sertoli cells – Immunological sentinels of
 687 spermatogenesis. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 30, p. 36-44, 2014.
 688 <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.011>.

689 KILCOYNE, K. R; MITCHELL, R. T. Effect of environmental and pharmaceutical
 690 exposures on fetal testis development and function: a systematic review of human
 691 experimental data. **Human Reproduction Update**, v. 25, n. 4, p. 397-421, 2019.
 692 <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmz004>.

693 KOOPMAN, P. *et al.* Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis
 694 differentiation. **Nature**, v. 348, n. 6300, p. 450-452, 1990.
 695 <http://dx.doi.org/10.1038/348450a0>.

696 LAWRENCE, B. M. *et al.* New Insights into Testosterone Biosynthesis: Novel Observations
 697 from HSD17B3 Deficient Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24,
 698 p. 15555–15555, dez. 2022.

699 LESLIE, H. A. *et al.* Discovery and quantification of plastic particle pollution in
 700 human blood. **Environment International**, v. 163, p. 107199, 2022.
 701 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>.

702 LI, H.; SPADE, D. J. Reproductive toxicology: environmental exposures, fetal testis
 703 development and function. **Reproduction**, v. 162, n. 5, p. 147-167, 2021.
 704 <http://dx.doi.org/10.1530/rep-20-0592>.

705 LI, L. *et al.* Hormone Regulation in Testicular Development and Function. **International**
 706 **Journal Of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 5805, 2024.
 707 <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25115805>.

708 LIN, H. *et al.* Involvement of testicular growth factors in fetal Leydig cell aggregation after
 709 exposure to phthalate *in utero*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n.
 710 20, p. 7218–7222, maio 2008.

711 LIN, H.-C. *et al.* Anatomical considerations, testicular, and scrotal anatomy of nonobstructive
 712 azoospermia patients. **Asian Journal of Andrology**, 14 fev. 2025.

713 LIU, Y. *et al.* Phthalate metabolites in breast milk from mothers in Southern China:
 714 occurrence, temporal trends, daily intake, and risk assessment. **Journal Of Hazardous**
 715 **Materials**, v. 464, p. 132895, 2024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132895>.

716 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using
 717 Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408,
 718 dez. 2001. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

719 LUÍS, C. *et al.* Comprehensive Insight from Phthalates Occurrence: from health outcomes
 720 to emerging analytical approaches. **Toxics**, v. 9, n. 7, p. 157, 2021.
 721 <http://dx.doi.org/10.3390/toxics9070157>.

722 MA, T. *et al.* Effects of In Utero Exposure to Di-n-Butyl Phthalate on Testicular
 723 Development in Rat. **International Journal of Environmental Research and Public**
 724 **Health**, v. 14, n. 10, p. 1284, 24 out. 2017.

725 MAGRE, S.; JOST, A. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. **Journal of**
 726 **Electron Microscopy Technique**, v. 19, n. 2, p. 172–188, 1 out. 1991.

727 MITAL, P.; HINTON, B. T.; DUFOUR, J. M.. The Blood-Testis and Blood-Epididymis
 728 Barriers Are More than Just Their Tight Junctions1. **Biology Of Reproduction**, v. 84, n. 5, p.
 729 851-858, 2011. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.110.087452>.

730 MOHAN, D. *et al.* Degradation of Plastics Waste and Its Effects on Biological Ecosystems:
 731 A Scientific Analysis and Comprehensive Review. **Biomedical Materials and Devices**, 15
 732 maio 2023.

733 MURASHIMA, A. *et al.* Essential Roles of Androgen Signaling in Wolffian Duct
 734 Stabilization and Epididymal Cell Differentiation. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1640-
 735 1651, 2011. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-1121>.

736 NORTH, E. J.; HALDEN, R. U.. Plastics and environmental health: the road ahead.
 737 **Reviews On Environmental Health**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2013.
 738 <http://dx.doi.org/10.1515/reveh-2012-0030>.

739 OECD, **Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060**. 2022. Disponível em:
 740 <https://doi.org/10.1787/aa1edf33-en>. Acesso em: 01 out. 2025.

741 OJEDA SR, ADVIS JP, ANDREWS WW. Neuroendocrine control of the onset of puberty
 742 in the rat. **Fed Proc**. 1980 May 15;39(7):2365-71. PMID: 6989642.st

743 OLIVEIRA, C. W. L. *et al.* First evidence of microplastic accumulation in placentas and
 744 umbilical cords from pregnancies in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v.
 745 97Suppl 3, n. Suppl 3, p. e20241298, 2025.

746 ONU, United Nations Global Perspective Human. **Tratado global contra poluição**
 747 **plástica pode ficar pronto até 2024**. 2023. Disponível em:
 748 <https://news.un.org/pt/story/2023/02/1809202>. Acesso em: 01 out. 2025.

749 ORTH, J. M. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative
 750 autoradiographic study. **The Anatomical Record**, v. 203, n. 4, p. 485–492, ago. 1982.

751 O'DONNELL, L.; WHILEY, P. A. F.; LOVELAND, K. L.. Activin A and Sertoli Cells: key
 752 to fetal testis steroidogenesis. **Frontiers In Endocrinology**, v. 13, 2022.
 753 <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.898876>.

754 PARK, E.-J. et al. Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible
 755 implications on reproduction and development of the next generation. **Toxicology Letters**, v.
 756 324, p. 75–85, 15 maio 2020.

757 PICUT, C. A.; ZIEJEWSKI, M. K.; STANISLAUS, D. Comparative Aspects of Pre- and
 758 Postnatal Development of the Male Reproductive System. **Birth Defects Research**, v. 110,
 759 n. 3, p. 190-227, 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/bdr2.1133>.

760 PICUT, C. A. *et al.* Postnatal Development of the Testis in the Rat. **Toxicologic Pathology**,
 761 v. 43, n. 3, p. 326-342, 2014. <http://dx.doi.org/10.1177/0192623314547279>.

762 PRATA, J. C. *et al.* Environmental exposure to microplastics: an overview on possible
 763 human health effects. **Science Of The Total Environment**, v. 702, p. 134455, 2020.
 764 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134455>.

765 PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland
 766 development. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 76, n. 6, p. 641–659,
 767 2008.

768 PROKOP, J. *et al.* Transcriptional analysis of the multiple Sry genes and developmental
 769 program at the onset of testis differentiation in the rat. **Biology Of Sex Differences**, v. 11, n.
 770 1, 2020. <http://dx.doi.org/10.1186/s13293-020-00305-8>.

771 RAGUSA, A. *et al.* Plasticenta: first evidence of microplastics in human
 772 placenta. **Environment International**, v. 146, p. 106274, 2021.
 773 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>.

774 REBOURCET, D. *et al.* Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult
 775 Leydig cell development in the prepubertal testis. **Development**, v. 141, n. 10, p. 2139-2149,
 776 2014. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.107029>.

777 REHMAN, Z. U. *et al.* Role and mechanism of AMH in the regulation of Sertoli cells
 778 in mice. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 174, p.
 779 133-140, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.08.011>.

780 ROSENFELD, C. S.. Bisphenol A and phthalate endocrine disruption of parental and
 781 social behaviors. **Frontiers In Neuroscience**, v. 9, 2015.
 782 <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00057>.

783 ROUILLER-FABRE, V. *et al.* Development of the foetal and neonatal testis. **Andrologia**,
 784 v. 35, n. 1, p. 79-83, 2003. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0272.2003.00540.x>.

785 SANSONE, A. *et al.* AMH and INSL3 in testicular and extragonadal pathophysiology: what
 786 do we know?. **Andrology**, v. 7, n. 2, p. 131-138, 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/andr.12597>.

787 SCARANO, W. R. *et al.* Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture During
 788 Prostate Development Induces MicroRNA Upregulation and Transcriptome Modulation in
 789 Rats. **Toxicological Sciences**, v. 171, n. 1, p. 84-97, 2019.
 790 <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfz141>.

791 SCOTT, H. M.; MASON, J. I.; SHARPE, R. M. Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its
 792 Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 7, p.
 793 883–925, dez. 2009.

794 SEDHA S., KUMAR S., SHUKLA S. Role of Oxidative Stress in Male Reproductive
 795 Dysfunctions with Reference to Phthalate Compounds. **Urol J**, v. 12, n.5, 2015 PMID:
 796 26571312.

797 SEKARAN, S.; JAGADEESAN, A. In Utero Exposure to Phthalate Downregulates
 798 Critical Genes in Leydig Cells of F1 Male Progeny. **Journal Of Cellular Biochemistry**,
 799 v. 116, n. 7, p. 1466-1477, 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.25108>.

800 SERRANO, S. E. et al. Phthalates and diet: a review of the food monitoring and
 801 epidemiology data. **Environmental Health**, v. 13, n. 1, 2 jun. 2014.

802 SIFAKIS, S. *et al.* Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male
 803 and female reproductive systems. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 51,
 804 p. 56-70, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>.

805 SKAKKEBAEK, N. E. *et al.* Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: influences
 806 of environment and genetic susceptibility. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 55-97,
 807 2016. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00017.2015>.

808 SMITH, L. B.; WALKER, W. H.. The regulation of spermatogenesis by androgens.
 809 **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 30, p. 2-13, 2014.
 810 <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2014.02.012>.

811 SONG, Y. K. *et al.* Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion
 812 on Microplastic Fragmentation by Polymer Type. **Environmental Science & Technology**,
 813 v. 51, n. 8, p. 4368-4376, 2017. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.6b06155>.

814 STANTON, P. G.. Regulation of the blood-testis barrier. **Seminars In Cell &**
 815 **Developmental Biology**, v. 59, p. 166-173, 2016.
 816 <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2016.06.018>.

817 SVECHNIKOV, K. *et al.* Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. **Journal**
 818 **Of Biomedicine And Biotechnology**, v. 2010, p. 1-10, 2010.
 819 <http://dx.doi.org/10.1155/2010/684504>.

820 TETRO, N. *et al.* The Placental Barrier: the gate and the fate in drug
 821 distribution. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 4, 2018.
 822 <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-017-2286-0>.

823 ULLAH, S. *et al.* A review of the endocrine disrupting effects of micro and nano plastic and
 824 their associated chemicals in mammals. **Frontiers In Endocrinology**, v. 13, 2023.
 825 <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2022.1084236>.

826 VETHAAK, A. D.; LEGLER, J. Microplastics and human health. **Science**, v. 371, n. 6530,
 827 p. 672-674, 2021. <http://dx.doi.org/10.1126/science.abe5041>.

828 VILAMAIOR, P. S.L.; TABOGA, S. R.; CARVALHO, H. F.. Postnatal growth of the
 829 ventral prostate in Wistar rats: a stereological and morphometrical study. **The Anatomical**
 830 **Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 288,
 831 n. 8, p. 885-892, jul. 2006. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.a.20363>.

832 VILLACORTA, A. *et al.* A new source of representative secondary PET nanoplastics.
 833 Obtention, characterization, and hazard evaluation. **Journal Of Hazardous Materials**, v.
 834 439, p. 129593, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129593>.

835 WANG, J. *et al.* Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces prepubertal testicular injury through
836 MAM-related mitochondrial calcium overload in Leydig and Sertoli cell apoptosis.
837 **Toxicology**, v. 509, p. 153956, 2024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2024.153956>.

838 WATKINS, D. J. *et al.* In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in
839 relation to female sexual maturation. **Environmental Research**, v. 134, p. 233-241, 2014.
840 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.010>.

841 WILSON, V. S. *et al.* Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with
842 reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. **Toxicology Letters**, v. 146, n. 3, p.
843 207–215, fev. 2004.

844 WRIGHT, S. L.; KELLY, F. J.. Plastic and Human Health: a micro issue?.
845 **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 12, p. 6634-6647, 2017.
846 <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.7b00423>.

847 WU, P. *et al.* Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics.
848 **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 184, p. 109612, 2019.
849 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109612>.

850 XI, W. *et al.* Effects of perinatal exposure to bisphenol A and di(2-ethylhexyl)-phthalate
851 on gonadal development of male mice. **Environmental Science and Pollution Research**,
852 v. 19, n. 7, p. 2515–2527, jul. 2012.

853 XIAO, Y. *et al.* Research progress on Sertoli cell secretion during spermatogenesis.
854 **Frontiers In Endocrinology**, v. 15, 2025. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2024.1456410>.

855 XU, E. G. *et al.* Primary and Secondary Plastic Particles Exhibit Limited Acute Toxicity but
856 Chronic Effects on *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 11, p.
857 6859-6868, 2020. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.0c00245>.

858 YE, L. *et al.* Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem
859 Leydig Cells. **Frontiers In Physiology**, v. 8, 2017.
860 <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2017.00430>.

861 YESILDEMIR, O; CELIK, M. N. Association between pre- and postnatal exposure to
862 endocrine-disrupting chemicals and birth and neurodevelopmental outcomes: an extensive
863 review. **Clinical And Experimental Pediatrics**, v. 67, n. 7, p. 328-346, 2024.
864 <http://dx.doi.org/10.3345/cep.2023.00941>.

865 YONG, C.; VALIYAVEETIL, S.; TANG, B. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics
866 in Mammalian Systems. **International Journal Of Environmental Research And Public
867 Health**, v. 17, n. 5, p. 1509, fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17051509>.

868 YOON, K. *et al.* Estrogenic Endocrine-Disrupting Chemicals: Molecular Mechanisms of
869 Actions on Putative Human Diseases. **Journal of Toxicology and Environmental Health**,
870 Part B, v. 17, n. 3, p. 127–174, 3 abr. 2014.

871 ZHOU, C.; GAO, L.; FLAWS, J. A.. Prenatal exposure to an environmentally relevant
872 phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. **Toxicology And Applied
873 Pharmacology**, v. 318, p. 49-57, mar.
874 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2017.01.010>.

CAPÍTULO II - Artigo “DEVELOPMENTAL EFFECTS OF INTRAUTERINE AND LACTATIONAL EXPOSURE TO NANOPLASTICS AND PHTHALATES ON RAT TESTIS”

Mirella Franco Moreira¹; Natália Magosso¹; Patrick Vieira de Souza¹; Matheus Naia Fioretto¹; Isabela Silva Ferreira¹; Vanessa Aguiar Rocha¹; Victória Cristina Pinha¹; Débora Hipólito Quadrelli²; Glaura Scantamburlo Alves Fernandes²; Luis Antonio Justulin¹; Jodi Anne Flaws³; Wellerson Rodrigo Scarano¹

¹ Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

² Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina (UEL), Londrina, Parana, Brazil.

³ College of Veterinary Medicine, University of Illinois, Urbana-Champaign, IL, USA

Corresponding author: Wellerson Rodrigo Scarano

São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences of Botucatu, SP, Brazil.

Zip Code: 18618-689

Phone number: +5514997883557

e-mail: wellerson.scarano@unesp.br

ABSTRACT

The toxicity of nanoplastics (NPs) and plastic additives such as phthalates, recognized endocrine-disrupting chemicals, remains insufficiently understood, particularly regarding their combined effects on male reproductive health across the lifespan. Since these contaminants can cross biological barriers, including the placenta, this study, grounded in the developmental origins of health and disease (DOHaD) concept, evaluated the effects of gestational and lactational exposure to NPs and a phthalate mixture (PM) on testicular development and function in male offspring. Pregnant SD rats were allocated to six groups: control (CTRL); T1 (20µg/kg/day PM); T2 (200mg/kg/day PM); T3 (NPs: 1mg/kg/day, 100nm); T4 (20µg/kg/day PM+NPs); and T5 (200mg/kg/day PM+NPs). Animals were exposed orally from gestational day 10 to postnatal day (PND)21. Male offspring were euthanized at PND22 (prepuberty) and PND120 (adulthood). At PND22, increased apoptosis in pachytene spermatocytes was observed in the T5 group compared with the CTRL, along with altered gene expression, including increased *Amh* (T4 vs.T1) and *Srd5a1* (T1–T4 vs. CTRL) and reduced *Ar* expression (T3 vs. CTRL). At PND120, the exposure decreased seminiferous tubule diameter (T2), epithelial height (T1–T5), and numbers of Sertoli (T2–T5) and Leydig cells (T4 and T5) compared to the CTRL. Histopathological alterations were more incident in the T1, T3, T4, and T5 compared to the CTRL, and reduced *Tjpl* expression in co-exposed animals suggested impairment of the blood–testis barrier. Redox analyses revealed age-dependent worsening of oxidative stress, particularly in co-exposure groups. Overall, gestational co-exposure to phthalates and NPs disrupts testicular morphology, gene regulation, and redox balance, indicating synergistic and persistent reproductive toxicity.

Keywords: maternal exposure; nanoplastics; oxidative stress; phthalates; testis.

1. INTRODUCTION

Driven by growing public and industrial demand, plastic production has expanded rapidly in recent decades (Kor *et al.*, 2020). In 2022, global production reached 400.3 million tons, and projections indicate that this figure could triple by 2060 (OECD, 2022; PlasticsEurope, 2023). However, the recycling rate remains low (at around 9%), favoring improper disposal and the consequent accumulation in the environment (Houssini, Li, Tan, 2025). In this dynamic, plastic waste undergoes degradation processes, giving rise to microplastics (MPs, particles < 5 mm) and nanoplastics (NPs, particles < 0,1 μm), which intensify environmental pollution (Costa, 2018).

The ubiquity of MPs and NPs has emerged as a global concern due to their potential impact on human health. The main route of exposure to MPs and NPs is through the ingestion of contaminated food and water, but exposure can also occur through inhalation and skin contact (Chen *et al.*, 2020). Once internalized, MPs and their toxic additives are capable of crossing several human biological barriers, such as the intestinal, blood-testicular, placental, and blood-brain barriers, allowing their systemic distribution and bioaccumulation in organs and tissues (Luo *et al.*, 2025).

In experimental models, pregnant rats exposed to polystyrene nanoparticles (PS-NPs; 25 nm) showed significant accumulation in the placenta and fetal tissues, highlighting their ability to cross the maternal-fetal barrier and access the fetal circulation, with the risk of compromising embryonic development (Cary *et al.*, 2023). Pre- and postnatal exposure to PS-NPs (100 nm; 0.1, 1, and 10 mg/L) affected the testis, resulting in reduced testicular weight, disorganization of the seminiferous epithelium, and decreased sperm count in mouse pups (Huang *et al.*, 2022). Furthermore, direct exposure to these particles in rats accumulated in various organs, but the testes showed the greatest retention (Amereh *et al.*, 2020). However,

there are still gaps regarding the toxicological effects of NPs on this important male organ, especially when co-exposed with chemical additives commonly found in plastics.

Among these additives, phthalates stand out due to their widespread use, providing flexibility, shine, and transparency to materials. However, since they are not covalently bound to the polymer matrix, they can leach into food, beverages, and other consumer products (Cao, 2009; Luis *et al.*, 2021). Consequently, phthalate metabolites have been detected in biological fluids including urine, breast milk, amniotic fluid, and semen (Wang *et al.*, 2014; Katsikantami *et al.* 2020; Liu *et al.*, 2024). Categorized as endocrine disrupting chemicals (EDCs), phthalates interfere with the functioning of the endocrine system, as observed in a study that evaluated in utero exposure to bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), which reported reduced serum levels of testosterone and estradiol in the offspring of male rats as well as a dose-dependent decrease in the expression of genes related to steroidogenesis such as steroidogenic acute regulatory protein (StAr), cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1 (*Cyp11a1*), 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD), 17β -hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD), 5α -reductase, and aromatase (Sekaran; Jagadeesan, 2015).

Due to their large surface area and hydrophobic character, nanoplastics can adsorb chemicals such as phthalates, becoming potential vehicles for bioaccumulation and biomagnification in organisms (Hu, Zhao, Xu, 2022). In one of the few co-exposure studies, Ma and collaborators showed that the combination of PS-NPs and di-n-butyl phthalate (DBP) intensified reproductive toxicity in mice, reducing sperm quality, compromising spermatogenesis, and promoting dysfunction in the blood-testis barrier (BTB) (Ma *et al.*, 2023). The BTB is formed by occlusive, adherent, and communicating junctions between Sertoli cells in the seminiferous tubule, acting to control the movement of substances into the lumen and expressing immunoregulatory factors that confer immune privilege to germ cells, protecting against the immune response and the action of reactive oxygen species (ROS)

(Mital; Hinton; Dufour, 2011; Kaur; Thompson; Dufour, 2014). Furthermore, it should be considered that, in the real environment, humans and animals are exposed to a mixture of phthalates (PM), which can intensify adverse effects (Ferguson *et al.*, 2014; Watkins *et al.*, 2014).

In this context, this study evaluated the effects of gestational and lactational exposure to PM and/or NPs on male reproductive parameters of offspring in two postnatal developmental periods: pre-puberty and adulthood. Changes in the testis were investigated immediately after lactation, with an emphasis on development and its persistent effects in adulthood, focusing mainly on the blood-testis-barrier. We hypothesized that exposure to PM and NPs, alone or in combination, compromises testicular development and morphophysiology leading to changes potentially associated with reproductive damage in the offspring throughout life.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

All reagents used were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): bis(2-ethylhexyl) phthalate – DEHP (CAS 93951-87-2, purity 99.5%), diethyl phthalate – DEP (CAS 84-66-2, purity 99.5%), di-n-butyl phthalate – DBP (CAS 93952-11-5, purity 99%), diisobutyl phthalate – DiBP (CAS 84-69-5), butylbenzyl phthalate – BBzP (CAS 85-68-7, purity 98%) and diisononyl phthalate – DiNP (CAS 28553-12-0, purity 99%). For exposure to nanoplastics, an aqueous suspension of polystyrene nanoparticles (PS-NPs, density 1.05 g/cm³; Sigma-Aldrich, CAT# 43302) containing particles with a diameter of 100 nm was used. The solution was homogenized by vigorous stirring and subsequently diluted in deionized water. Although the size of the nanospheres was not measured experimentally in this study, the manufacturer provides a certificate of analysis on its website (<https://www.sigmaaldrich.com/certificates/Graphics/COfAInfo/fluka/pdf/PDF759362.pdf>)

and studies using the same PS-NPs formulation (#43302) confirmed, using appropriate microscopic techniques, both the diameter and morphology of these particles (Poma *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2023).

2.2. Animals and experimental design

Adult 120-day-old Sprague Dawley rats (males n=15; females n=50) from the Multidisciplinary Center for Biological Research in the Area of Laboratory Animal Science (CEMIB/UNICAMP) were kept in the animal facility of the Department of Morphology of IBB/UNESP, under controlled conditions of light (12h light cycle/12h dark cycle), temperature (average 22–24°C), and provision of filtered water in glass bottles and a balanced diet free of soy and alpha-phytoestrogen (NUVILAB-CR1, Quimtia, Brazil). On postnatal day (PND) 120, the estrous cycles of females were checked before mating. For reproduction, males were rotated between cages and paired with two females (2:1) overnight. The following morning at 8:00 a.m., vaginal swabs were performed on the females, and day zero of gestation (GD 0) was established by sperm detection and subsequent monitoring of weight gain.

The pregnant rats were randomly assigned to 6 experimental groups (n= 7–13/group): CTRL: control group, treated with corn oil/water; T1: 20 µg/kg/day of the phthalate mixture (PM) diluted in corn oil; T2: 200 mg/kg/day of the PM diluted in corn oil; T3: 100 nm nanoplastics composed of polystyrene nanoparticles (NPs) at a concentration of 1.0 mg/kg/day diluted in distilled water; T4: 20 µg/kg/day of PM + NPs (100 nm; 1.0 mg/kg); and T5: 200 mg/kg/day of PM + NPs (100 nm; 1.0 mg/kg). Treatments were administered orally (direct pipetting into the oral cavity) from GD 10 to PND 21, encompassing the gestation and lactation periods.

Throughout the experimental protocol, pregnant or lactating rats were kept in individual cages and weighed on alternate days to adjust the volume of PM and NP solutions to be administered. Clinical observations for possible signs of toxicity — including changes in body

weight, diarrhea, piloerection, bleeding, respiratory changes, tremors, seizures, as well as disturbances in gait, posture, and response to handling — were performed daily, concurrently with treatment. After birth, the litters were standardized to contain 8 pups, prioritizing, whenever possible, maintaining a 1:1 male-to-female ratio. Furthermore, litters with fewer than 8 pups were discarded. This intervention was necessary because excessive competition for milk in larger litters can introduce variability into experimental data, affecting results based on body weight, behavior, and physiology. Standardization ensures similar growth conditions, an essential factor for the reproducibility and validity of results (Baumans, 2004).

At PND22, male offspring ($n = 7-9$ per group) were weighed, the anogenital distance (AGD) was measured and later anesthetized with xylazine (5 mg/kg of body weight) combined with ketamine (80 mg/kg of body weight). AGD adjusted by body weight was calculated as described by Gallavan et al. (1999). After anesthesia induction, laparotomy and blood collection were performed. Subsequently, the testes were dissected and weighed, with the right testes being used for histological analysis and the left for molecular analysis. The remaining siblings were kept in the animal facility until PND120 ($n = 7-9$ per group), when they underwent the same anesthesia and euthanasia protocol described for the animals at PND22 (Figure 1). The experimental procedures were carried out in accordance with the standards established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the experimental protocol was submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Institute of Biosciences of UNESP in Botucatu (Protocol: 1174020523) (Appendix 2).

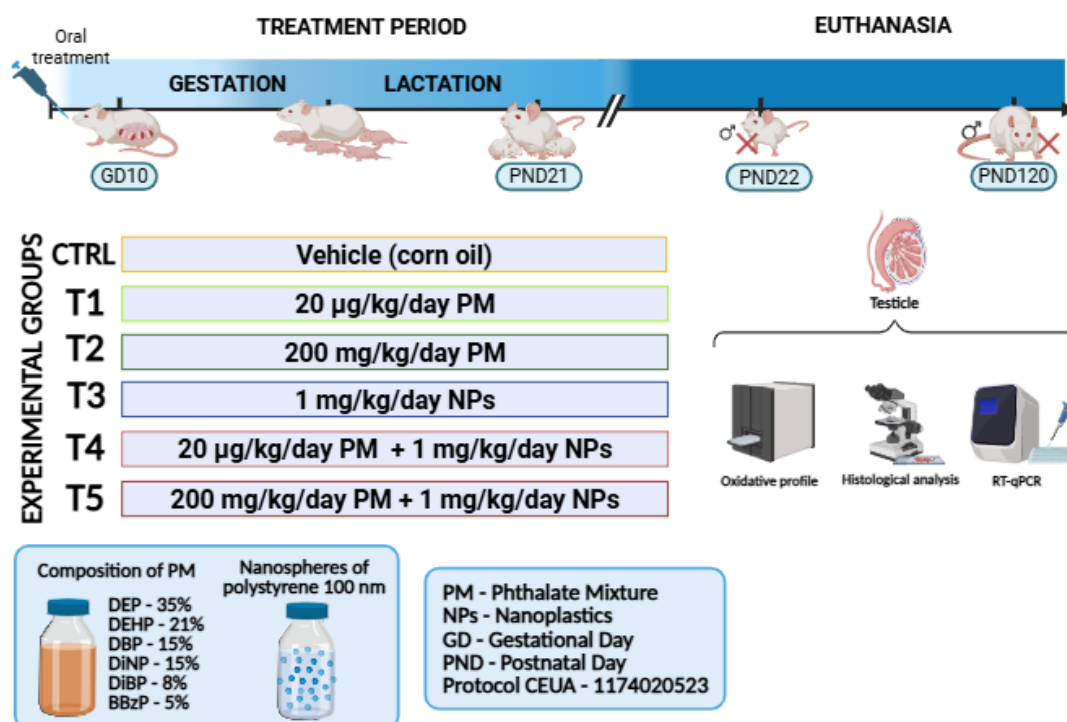


Figure 1. The experimental design includes the treatment protocol, experimental groups, administered doses, and the composition of the phthalate mixture (PM). Pregnant Sprague Dawley rats received daily oral treatment from gestational day 10 (GD10) until postnatal day 21 (PND21). Animals were randomly assigned to six groups: CTRL (control group), vehicle (corn oil/water); T1, 20 µg/kg/day of PM; T2, 200 mg/kg/day of PM; T3, 1 mg/kg/day of 100 nm nanoplastics (NPs); T4, 20 µg/kg/day of PM + 1 mg/kg/day of NPs; and T5, 200 mg/kg/day of PM + 1 mg/kg/day of NPs. At the end of the lactation period (PND21), male offspring were euthanized at two time points—PND22 (prepubertal) and PND120 (adult). Testes were collected for histological and molecular analyses, as well as evaluation of the oxidative profile.

2.3. Dose justification

The formulation of the phthalate mixture was established based on the composition and proportions derived from phthalate metabolite levels quantified in urine samples from pregnant women, resulting in the following proportional distribution: 21% DEHP (2-ethylhexyl phthalate), 35% DEP (diethyl phthalate), 15% DBP (di-n-butyl phthalate), 8% DiBP (diisobutyl phthalate), 5% BBzP (benzyl butyl phthalate), and 15% DiNP (diisononyl phthalate) (Zhou; Gao; Flaws, 2017). The lowest dose in our study (20 µg/kg/day) mimics human exposure, containing ~4 µg/kg/day of DEHP, which is considered a tolerable daily intake level (EPA. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, 1996). A higher

dose (200 mg/kg/day) includes ~100 mg/kg/day of DEHP, exceeding environmental exposure (Zhou; Gao; Flaws, 2017; Scarano *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2021). For comparison, the estimated daily exposure to DEHP, a common phthalate, is 5,7–42,1 µg/kg/day (Serrano *et al.*, 2014). Other phthalates have exposure ranges of 2.32 – 12 µg/kg/day (DEP), 0.26 – 0.88 µg/kg/day (BzBP), 0.84 – 5.22 µg/kg/day (DBP), 0.12 – 1.4 µg/kg/day (DiBP), and up to 26 µg/kg/day (DiNP) (Doull *et al.*, 1999; Kavlock *et al.*, 2002).

2.4. External physical signs of the onset of puberty

Male offspring from all experimental groups (n = 6-13 per group) were monitored for external genital development as an indicator of male sexual maturation. For this assessment, the timing of preputial separation was recorded through daily examinations starting at PND33, by gently retracting the prepuce.

2.5. Light microscopy and morphometric analysis

Testicular samples collected at PND22 and 120 were fixed by immersion in Davidson's solution for 24 hours at 4°C, transferred to 70% alcohol, and subsequently processed for embedding in Paraplast® (Sigma-Aldrich®). Histological sections of 5 µm were obtained using a rotary microtome. The sections were semi-serialized at 50 µm intervals and mounted on silanized slides for subsequent hematoxylin-eosin (HE) staining for general morphological study. The microscopic fields were digitized using the capture system coupled to an AxioLab A1 photomicroscope (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany). The digitized HE-stained sections had parameters analyzed according to age.

At PND22, the presence of apoptotic figures in pachytene spermatocytes was investigated (n = 6-7 per group), analyzing 42 quadrants per animal under 200× total magnification (Picut *et al.*, 2014). At PND120, the organization of the germinal epithelium, already in its mature phase, was evaluated by analyzing 10 seminiferous tubules per animal

(n = 4-7 per group) at stage IX of spermatogenesis. Digitized images of histological fields (200× magnification) were used to perform measurements of the seminiferous tubules diameter and germinal epithelium height (4 measures per tubule), from which the mean for each parameter was obtained and used for statistical analysis (Siervo *et al.*, 2015). Furthermore, to quantify mature Sertoli cells and adult Leydig cells, Sertoli cell nuclei were counted under light microscopy in 10 seminiferous tubules per rat in stage VII of spermatogenesis and Leydig cell nuclei in 10 random interstitial fields under 200× magnification (Favareto *et al.*, 2011).

Histopathological analyses were also performed (PND120) using cross-sections of the organ (3 non-consecutive sections per animal), with the aid of light specificity (magnifications of 200 and 400X). The presence of acidophilic cells, multinucleated cells, retained speciation, degeneration of cell types, vacuolization of the epithelium, and immature germ cells were noted in 50 sections of seminiferous tubules per animal (n = 5) (Siervo *et al.*, 2015).

2.6. Evaluation of the oxidative profile

Testicular samples collected at PND22 and 120 (n = 4-5/group/age) were homogenized with an Ultraturrax homogenizer (Marconi, Piracicaba, Brazil) in phosphate-saline buffer (pH 7.2) and normalized to 1 mg of proteins/mL, according to the Bradford method (Bradford, 1976). From this homogenate, the concentrations of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), total glutathione (TG), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were determined.

2.6.1. Lipoperoxidation

The concentration of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) was used to quantify lipid peroxidation, according to the method described by Federici (Federici; Shaw; Handy, 2007). TBARS levels were determined by the difference in absorbances at 535 and 572 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). The results were expressed in nanomoles of TBARS/mg of protein.

2.6.2. Superoxide dismutase activity

SOD enzyme activity was determined according to that proposed by Senthikulmar with adaptations by Erthal and collaborators (Erthal *et al.*, 2020). The method is based on the quantification of complexes formed by superoxide anions with nitroblue tetrazolium and sodium hydroxylamine hydrochloride (NH₂OH.HCl), with a blue coloration, whose absorbance was measured at 560 nm for 2 min at 15 s intervals. The results were expressed in SOD units/mg of protein.

2.6.3. Catalase activity

CAT activity was determined by the degradation of hydrogen peroxide into water and oxygen. The absorbance of the reaction was measured at 240 nm for 1 min, at 15 s intervals. The results were expressed in nM/minute/mg protein.

2.6.4. Glutathione

The concentrations of reduced glutathione (GSH) were determined according to the method proposed by Rahman and collaborators (Rahman; Kode; Biswas, 2006). The method is based on the reaction between 5,5-dithiobis 20-nitrobenzoic acid and GSH, resulting in a yellowish product, whose absorbance is measured at 412 nm. The results were expressed in μ mol/mg of protein.

For total glutathione (TG), the method is based on the reduction of oxidized glutathione (GSSG) in the sample by the addition of NADPH, in a reaction catalyzed by glutathione reductase (GR), which is also added to the medium. Subsequently, the total glutathione, now reduced, is also quantified by reaction with DTNB with absorbance measured at 412 nm after 15 minutes of incubation of the samples with the reaction medium. The results were expressed in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein.

The concentration of GSSG was calculated according to that proposed by Carrara and collaborators (Carrara *et al.*, 2019), taking into account the stoichiometry of the reaction. The GSSG values were calculated following the equation: $\text{GSSG } (\mu\text{mol}) = [\text{TG}] - [\text{GSH}]/2$. The results were expressed in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein.

The activity of the glutathione S-transferase (GST) enzyme was evaluated as proposed by Van Der Aar and collaborators (Van der Aar *et al.*, 1996). Spectrophotometrically by means of the reduction of GSH and lysis of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with formation of thioesters. The absorbance of the reaction was measured at 340 nm for 5 min in 40 s intervals. The results were expressed as nM of thioether formed per minute per mg of protein.

2.7. Gene Expression by RT-qPCR

Testicular samples collected at PND22 and 120 were stored at -80°C until analysis. Total RNA extraction ($n = 4\text{-}5$ animals/group/age) was performed using TRIzol® reagent (Ambion, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were assessed spectrophotometrically using a NanoVue™ Plus (GE Healthcare Life Sciences, USA). cDNA synthesis was performed using the iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA).

Specific primers were designed using Primer Express® software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) from sequences available in GenBank

(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) and synthesized by Exxtend Biotechnology (Paulínia, SP, Brazil). Real-time PCR reactions were performed in duplicate for each gene using the QuantStudio™ (Life Technologies, USA), and amplification graphs were generated individually for each sample.

Relative quantification of gene expression was determined by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, according to Livak and Schmittgen (Livak; Schmittgen, 2001). The values obtained were normalized by the ratio of the target gene to the endogenous gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*). At PND22, genes related to the differentiation and development of Sertoli and Leydig cells androgen receptor (*Ar*), anti-mullerian hormone (*Amh*), insulin-like peptide 3 (*InsI3*) were evaluated, as well as genes involved in testicular steroidogenesis 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (*Hsd17b1*), steroid 5 α -reductase type 1 (*Srd5a1*), cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 (*Cyp19a1*). At PND120, genes associated with the integrity of the blood-testis barrier tight junction protein 1 (*Tjp1*), Occludin (*Ocln*), transforming growth factor beta 2 (*Tgfb2*) were analyzed.

2.8. Plasma hormone levels

After euthanasia of the males, blood was collected in heparinized tubes for plasma hormone measurements. The material was centrifuged at 3,000 rpm, 4°C, for 20 minutes, and the plasma separated and frozen for later analysis. Plasma testosterone analysis was performed using a competitive enzyme immunoassay kit (Testosterone ELISA Kit, USCN Life Science Inc., Wuhan, China; cat. no. CEA458Ge), according to the manufacturer's instructions. Hormone concentrations were determined by extrapolation from a standard curve constructed with known testosterone concentrations. The assay has a detection range of 370.4 to 30,000 pg/mL and an analytical sensitivity of less than 162.3 pg/mL. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were less than 10% and 12%, respectively.

2.9. Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ standard of the mean (SD) or as median accompanied by the interquartile range (q1–q3). For the analysis of quantitative and morphometric data, analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test was used. For statistical analyses, the following comparisons were considered: all treated groups (T1, T2, T3, T4 and T5) vs. the control group (CTRL); T4 vs. T1; T5 vs. T2; T4 and T5 vs. T3. Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

3.1. Body and testicular weight

In the biometric evaluation of prepubertal rats (PND22), no significant differences in body weight (BW) were observed among the groups, but absolute testis weight decreased in T4 compared to T3, and relative weight decreased in T1 vs. CTRL (Table 1). However, in adulthood (PND120), groups T1 and T2 showed a significant increase of BW in relation to the CTRL (Table 1). Additionally, BW decreased in the T5 compared to T2. Absolute testicular weight showed no statistically significant differences, whereas relative testicular weight increased in the T5 vs. T2 group (Table 1).

Table 1. Effect of exposure to plastic pollutants on body weight and absolute testicular weight at PND22 (n = 7–9/group) and PND120 (n= 7–9/group) in male offspring rats. Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; and significant when * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Parameters	Experimental groups
------------	---------------------

	CTRL	T1	T2	T3	T4	T5
Postnatal day 22						
Body weight (g)	43.9 ± 5.51	46.2 ± 9.30	45.1 ± 8.90	47.6 ± 10.24	42.1 ± 4.72	45.5 ± 1.52
Absolute testicular weight (g)	0.105 ± 0.03	0.090 ± 0.05	0.110 ± 0.03	0.119 ± 0.02	0.088 ± 0.03 *T3	0.119 ± 0.02
Relative testicular weight (g)	0,268 ± 0,01	0,190 ± 0,09 ***CTRL	0,260 ± 0,01	0,255 ± 0,01	0,235 ± 0,02	0,270 ± 0,03
Postnatal day 120						
Body weight (g)	444.3 ± 24.39	521.7 ± 79.85 *CTRL	535.0 ± 93.96 **CTRL	501.3 ± 51.02	494.9 ± 63.26	458.5 ± 36.81 *T2
Absolute testicular weight (g)	1.661 ± 0.20	1.786 ± 0.19	1.748 ± 0.14	1.867 ± 0.33	1.712 ± 0.17	1.723 ± 0.06
Relative testicular weight (g)	0,347 ± 0,03	0,347 ± 0,05	0,300 ± 0,07	0,376 ± 0,08	0,348 ± 0,03	0,408 ± 0,08 **T2

3.2. Anogenital distance and prepuce separation

Anogenital distance (AGD) was measured and adjusted for body weight on PND1 and PND22. On PND1, an increase in AGD was observed in the T3 group compared to the CTRL group (Fig. 2a). On PND22, there was an increase in AGD in the T3 and T4 groups compared to the CTRL group (Fig. 2b). Furthermore, a delay in the occurrence of preputial separation was observed in the T3 group compared to the CTRL group (Fig. 2c).

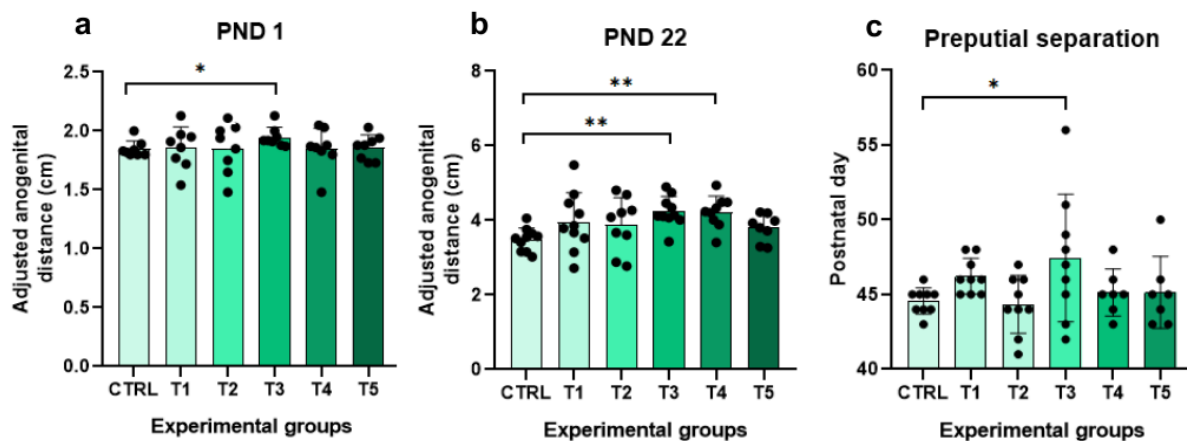


Figure 2. Measurement of anogenital distance on PND1 and 22 and monitoring of prepuce separation age in male offspring. (a) Anogenital distance on PND1 (n = 8/group). (b) Anogenital distance on PND 22 (n = 8–10/group). (c) Age of preputial separation (n = 7–9/group). Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; and significant when * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

3.3. Analysis of apoptosis in spermatocytes in pachytene in prepuberty (PND22)

Figure 3a is a representative image of the T5 group, showing apoptosis in spermatocytes at the pachytene stage. The quantification of spermatocytes in apoptotic pachytene revealed a significant increase in this parameter in the T5 group compared to the CTRL and T3 groups on PND22 (Fig. 3 b).

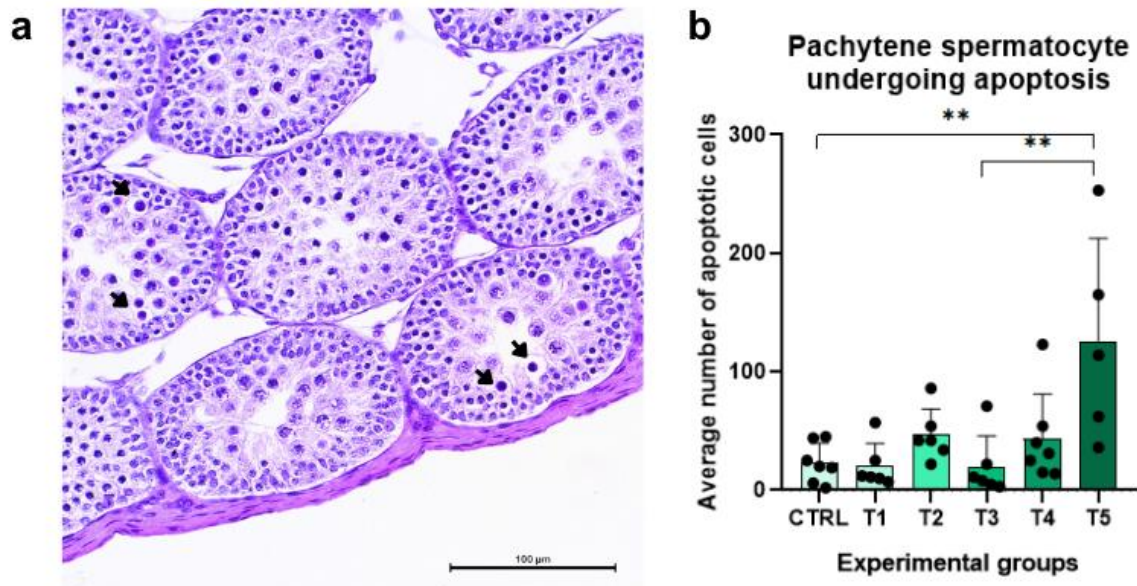


Figure 3. Quantification of the mean number of spermatocytes in the pachytene stage in seminiferous tubules of rats on PND22. (a) Representative photomicrograph of seminiferous tubules with pachytene spermatocytes undergoing apoptosis in the T5 group, highlighted by the arrow. (b) Quantification of the mean number of pachytene spermatocytes undergoing apoptosis per tubule on PND22 (n = 6–7/group). Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; and significant when *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01.

3.4. Histological and morphometrical analysis in adulthood (PND120)

Morphometric analyses of the diameter and height of the germinal epithelium were performed in the seminiferous tubule at stage IX of spermatogenesis (Fig. 4 a, b). There was a reduction in the diameter of the seminiferous tubules in the T2 group in relation to the CTRL (Fig. 4 d). In relation to the seminiferous epithelium thickness, all treated groups (T1, T2, T3, T4 and T5) showed a reduction in this parameter compared to the CTRL (Fig. 4 c). Additionally, there was a reduction in the seminiferous epithelium thickness in the T4 group in relation to the T1 and T3 groups (Fig. 4 c). Furthermore, in the quantitative analysis of Sertoli cell quantity, there was a significant reduction in the T2, T3, T4, and T5 groups compared to the CTRL (Fig. 4 e). Considering Leydig cells quantity, there was a decrease only in the groups with double exposure (T4 and T5) compared to the CTRL (Fig. 4 f).

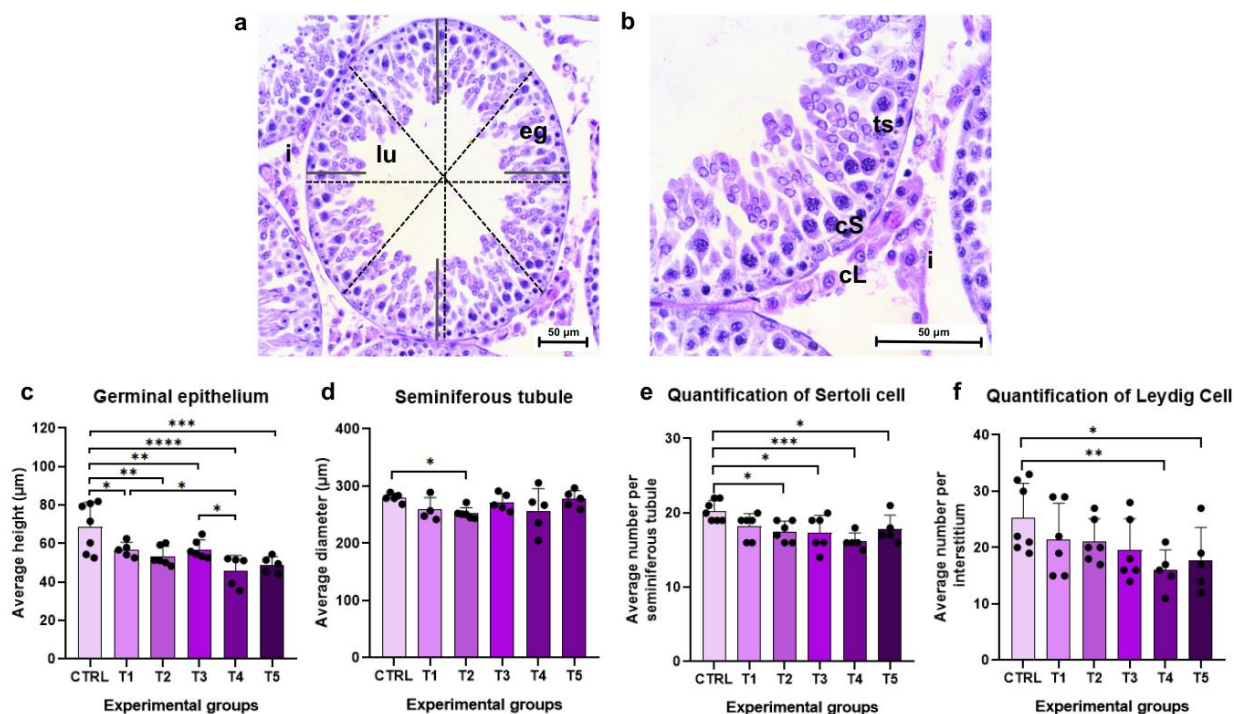


Figure 4. (a, b) Representative photomicrograph of the control group testis in stage IX of spermatogenesis, stained with hematoxylin and eosin. The four diameter measurements are indicated in black dashed lines, while the four germinal epithelium height measurements are indicated in solid gray lines. Objective 20x (a) and 40x (b). Abbreviations: i - interstitium; lu - lumen; ge - germinal epithelium; st - seminiferous tubule; Sc - Sertoli cell; Lc - Leydig cell. (c) Mean diameter of the seminiferous tubule (μm). (d) Mean height of the germinal epithelium (μm). (e) Quantification of the mean number of Sertoli cells per tubule. (f) Quantification of the mean number of Leydig cells. Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean ± SD; (n = 4–7/group) and significant when *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001.

3.5. Histopathological analyses (PND120)

In the seminiferous tubules, a significant increase in vacuolization was observed in the T4 and T5 groups compared to CTRL and T3 groups and their respective isolated groups (T1 and T2) (Fig. 5 a, c). Meanwhile, the presence of immature cells in the seminiferous tubule lumen increased in the T1, T3, and T4 groups compared to CTRL (Fig. 5 b, d). In addition, acidophilic cells (Fig. 5 e), multinucleated cells, and degeneration (Fig. 5 f) were observed in the germinal epithelium, but there were no significant differences between groups.

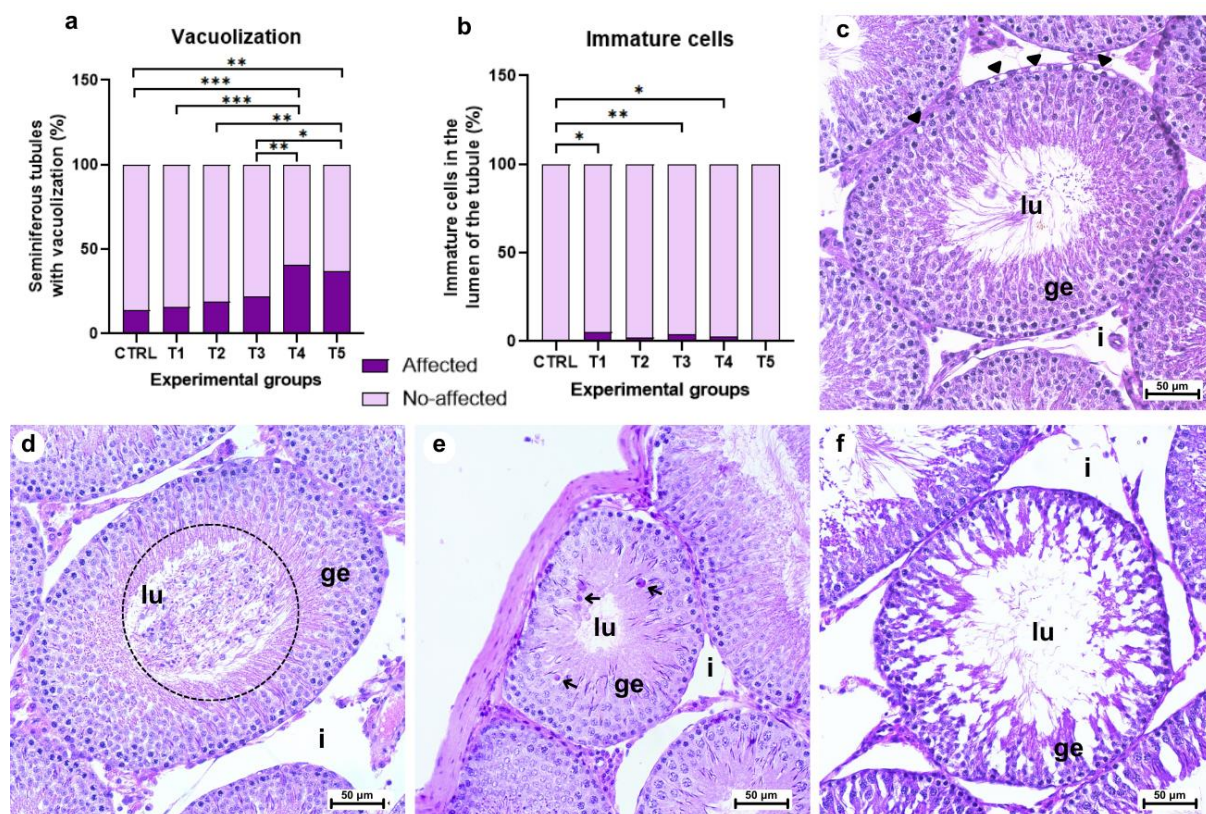


Figure 5. Histopathological analysis of seminiferous tubules. (a) Graph showing the percentage of vacuolization in the seminiferous tubule. (b) Graph showing the percentage of immature germ cells in the tubule lumen. Representative photomicrographs of histopathological findings at 200x magnification. (c) Vacuolization (arrow). (d) Germ cells in the seminiferous tubule lumen (circle). (e) Presence of acidophilic cells (arrow). (f) Degeneration of the germinative epithelium. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=5/group). ANOVA followed by Tukey's post-test. Significant when *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Abbreviations: i- interstitium, ge- germinative epithelium, lu- lumen.

3.6. Gene expression in prepuberty (PND22)

Amh expression increased in the T4 group compared to the T1 group (Fig. 6 a). Likewise, *InsI3* increased in the T1 group when compared to the CTRL, and expression in the T4 group was decreased compared to the T1 group (Fig. 6 b). *Ar* expression was lower in the T3 group compared to the CTRL (Fig. 5 c). In genes related to the steroidogenic pathway, no significant changes in *Hsd17b1* and *Cyp19a1* expression were observed between the groups (Fig. 6 d, e). Furthermore, *Srd5a1* expression was significantly higher in the T1, T2, T3, and T4 groups compared to the CTRL (Fig. 6 f).

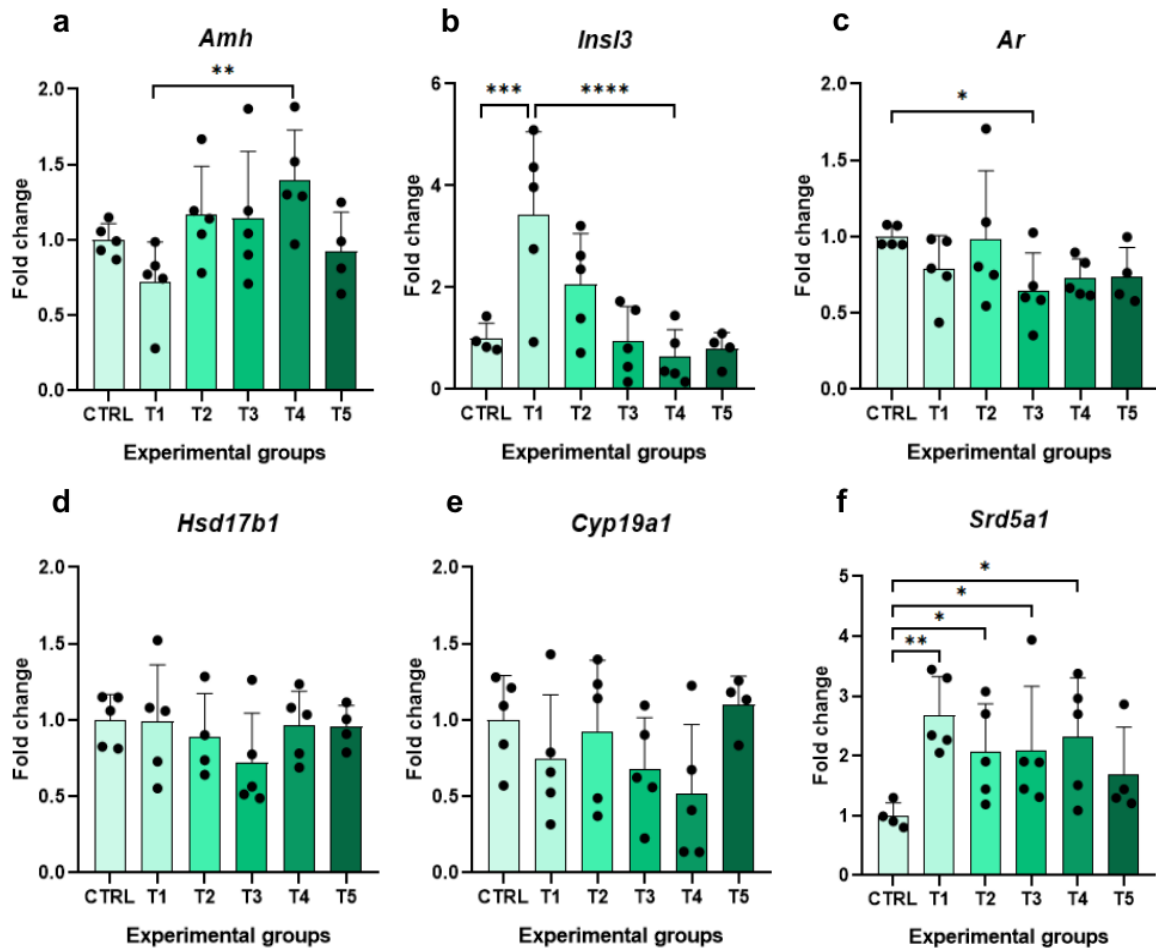


Figure 6. Effect of gestational and lactational exposure to a mixture of phthalates and nanoplastics in offspring rats on PND22 on relative mRNA levels in genes involved in testicular development and maturation and the steroidogenic pathway. (a) Anti-Müllerian hormone (*Amh*). (b) Insulin-3 (*InsI3*). (c) Androgen receptor (*Ar*). (d) 17-beta dehydrogenase 1 (*Hsd17b1*). (e) Aromatase (*Cyp19a1*). (f) Steroid 5 alpha-reductase 1 (*Srd5a1*). Gene expression is given by the quantification of $2^{-\Delta\Delta CT}$ and data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; n = 4–5/group and significant when * $P \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, and **** $P \leq 0.0001$.

3.7. Gene expression in adulthood (PND120)

Gene expression analysis on PND120 focused on the blood-testis barrier and revealed an increase in *Ocln* in the T2 group compared to the CTRL (Fig. 7 a). In relation to the *Tjp1* expression, there was a decrease in the T4 and T5 groups compared to the CTRL, and a decrease

in the T5 group compared to the T2 group (Fig. 7 b). In addition, no alteration in the *Tgfb2* expression was observed among the groups (Fig. 7 c).

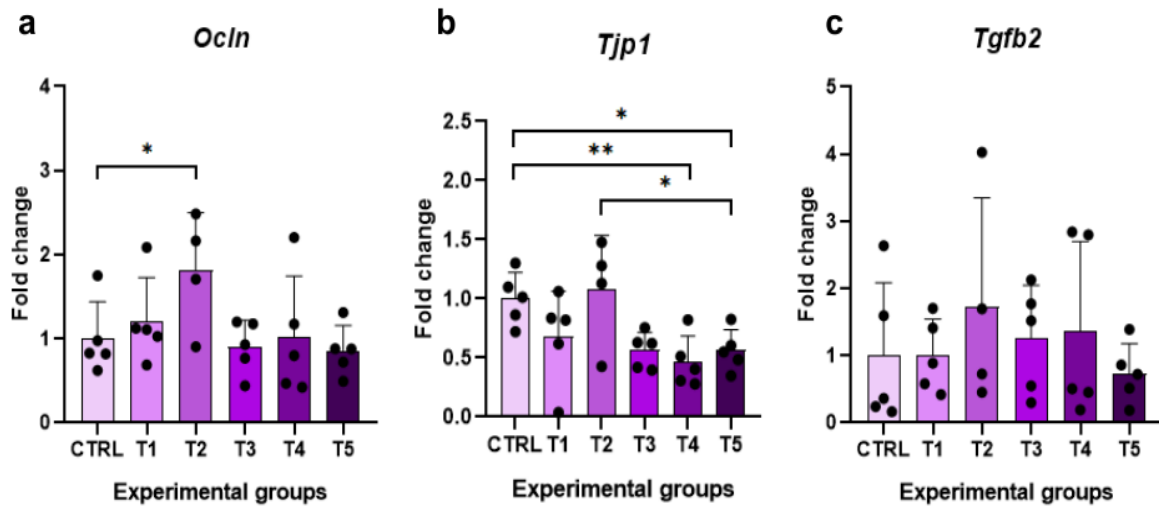


Figure 7. Late effect (PND120) of gestational and lactational exposure to a mixture of phthalates and nanoplastics in rat offspring on relative mRNA levels in genes of the blood-testis barrier junction and in the growth factor gene. (a) Occludin (*Ocln*). (b) Tight junction protein 1 (*Tjp1*). (c) Transforming growth factor beta 2 (*Tgfb2*). Gene expression is given by the quantification of $2^{-\Delta\Delta CT}$ and data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; n = 4–5/group; and significant when *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01.

3.8. Analysis of the oxidative profile (PND22 and 120)

The analysis of the oxidative status in prepubertal age (PND22) revealed that superoxide dismutase (SOD) activity significantly increased in the T4 and T5 groups compared to the CTRL, in the T4 group compared to the T1 group, and in the T5 group compared to T2 group (Fig. 8 a). For catalase (CAT) activity, there was a reduction in the T3 and T4 groups compared to the CTRL, whereas the T5 group showed an increase compared to the T3 group (Fig. 8 b).

In the lipid peroxidation (TBARS) assessment, there was an increase in the T3 group compared to the CTRL. On the other hand, there was a decrease in T4 group compared to the T1 and the T3 groups. Additionally, the T5 group showed a reduction compared to the CTRL, T2 and the T3 groups (Fig. 8 c).

The total glutathione (TG) concentration decreased in the T5 group compared to the CTRL, and in relation to the T2 and T3 groups, while there was an increase in the T4 group compared to the T1 group (Fig. 8 d). Regarding oxidized glutathione (GSSG) levels, there was a decrease in the T4 group compared to the CTRL, T1, and T3 groups (Fig. 8 e). Reduced glutathione (GSH) levels decreased in T5 group compared to the CTRL, T2, and T3 groups, whereas the T4 group showed an increase compared to the T1 group (Fig. 8 f). Finally, glutathione S-transferase (GST) did not differ significantly among the groups (Fig. 8 g).

Regarding the oxidative status at PND120, SOD activity showed a reduction in the T2, T4 and T5 groups compared to the CTRL, in the T4 group compared to the T1 group, and in the T5 group compared to the T3 group (Fig. 8 h). In relation to the CAT activity, a decrease was observed in the T4 and T5 groups compared to the CTRL, in the T4 compared to the T1 group, in the T5 group compared to the T2 group, and in the T4 and T5 groups compared to the T3 group (Fig. 8 i). In TBARS groups T2, T3, and T4 had increased levels of TBARS compared to the CTRL. In contrast, TBARS levels were reduced in the T5 group compared to the T2 and T3 groups (Fig. 8 j).

The total glutathione (TG) concentration increased in the T1 and T3 groups compared to the CTRL. On the other hand, TG was decreased in the T4 and T5 groups compared to the CTRL, in the T4 group compared to the T1 group, in the T5 group compared to the T2 group, and in the T4 and T5 groups compared to the T3 group (Fig. 8 k). For GSSG and GSH, the results were similar to those obtained for the TG (Fig 8 l, m). Finally, GST activity increased in the T1 group compared to the CTRL and decreased in the T5 group compared to the CTRL. In addition, GST activity decreased in the T4 group compared to the T1 group, in the T5 group compared to the T2 group, and in the T4 and T5 groups compared to the T3 group (Fig. 8 n).

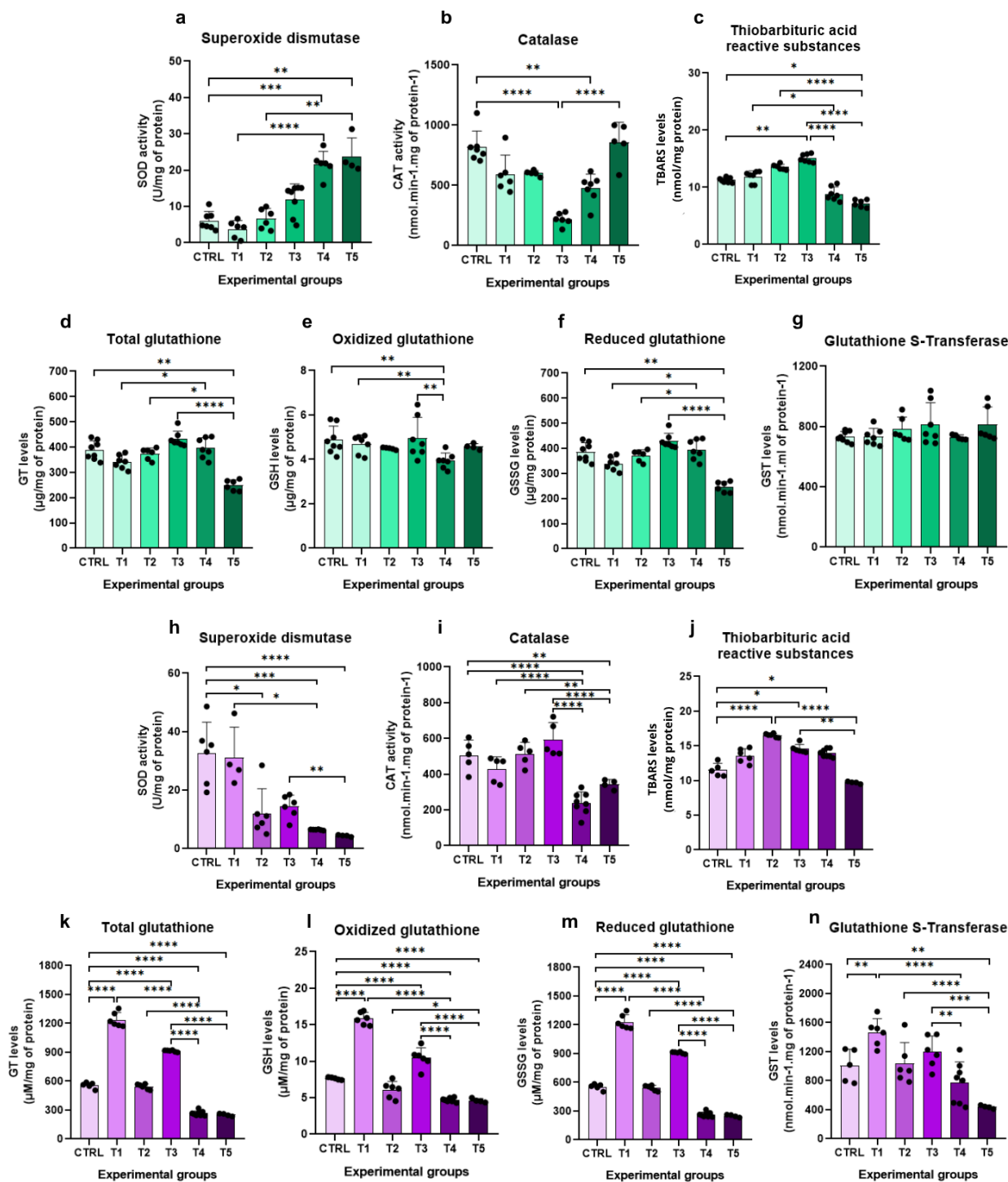


Figure 8. Oxidative stress analysis on postnatal days 22 and 120. (a) Superoxide dismutase on PND 22. (b) Catalase on PND 22. (c) Thiobarbituric acid reactive substances on PND 22. (d) Total glutathione on PND 22. (e) Oxidized glutathione on PND 22. (f) Reduced glutathione on PND 22. (g) Glutathione S-transferase on PND 22. (h) Superoxide dismutase at PND 120. (i) Catalase on PND 120. (j) Thiobarbituric acid reactive substances at PND 120. (k) Total glutathione on PND 120. (l) Oxidized glutathione on PND 120. (m) Reduced glutathione on PND 120. (n) Glutathione S-Transferase on PND 120. Data were analyzed by ANOVA when parametric, followed by Tukey, or Kruskal-Wallis test when nonparametric, followed by

Dunn's test and values were expressed as mean $\pm$ SD; (n = 4–5/group/age); and significant when *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01, ***P $\leq$ 0.001, and ****P $\leq$ 0.0001.

3.9. Plasma testosterone levels

No significant differences were observed between the groups in plasma testosterone concentrations at either age evaluated (Fig. 9 a, b).

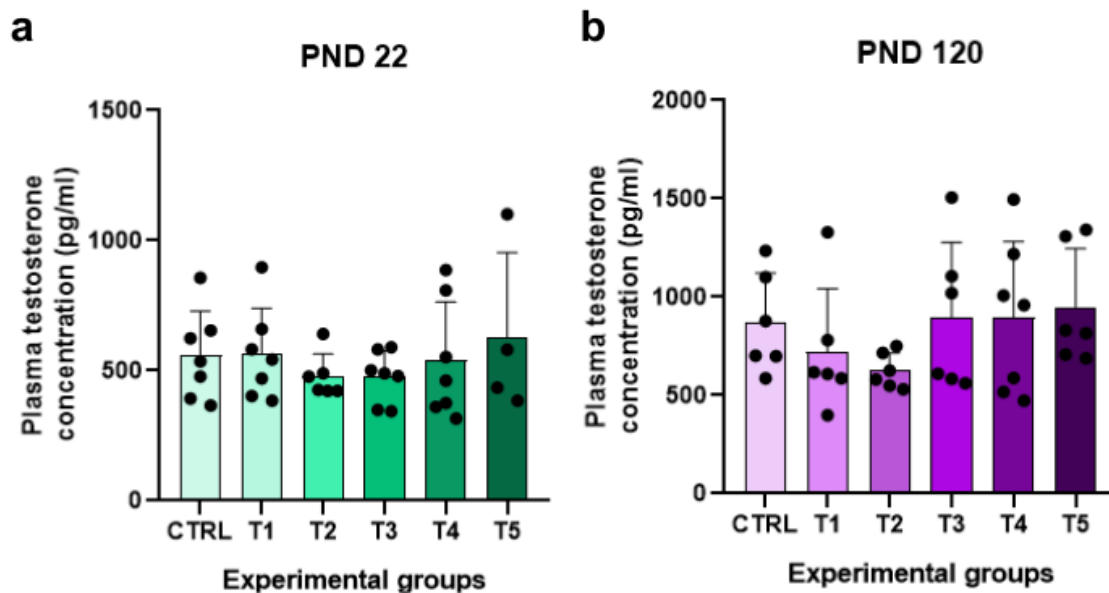


Figure 9. Plasma testosterone levels on postnatal days 22 (a) and 120 (b) (n = 4–7 per group). Data were analyzed by ANOVA when they presented a parametric distribution, followed by Tukey's test, or by the Kruskal–Wallis test when non-parametric, followed by Dunn's test. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

4. DISCUSSION

The main novelty of this study was to elucidate the impacts of gestational and lactational exposure to a mixture of phthalates and/or nanoparticles (NPs) on the testicular health of pre-pubertal and adult offspring. Our results demonstrate an impact of phthalates and/or NPs on germ cells, molecular parameters, and antioxidant defenses that compromise testicular maintenance even before puberty. Notably, these adverse effects were exacerbated in adulthood, representing a threat to male fertility. The main alterations observed in this study

involved distinct mechanisms through which phthalates and/or NPs disrupt testicular structural integrity and redox homeostasis, potentially compromising the blood–testis-barrier (BTB) as well as spermatogonial reserve, spermatogenesis, and spermiogenesis. The results indicate that the testis is a particularly vulnerable organ to early exposure to these contaminants, whose effects tend to manifest or worsen throughout adulthood.

In the present study, significant differences in body weight gain were observed only in adulthood. Previous studies corroborate these findings, demonstrating that mice exposed prenatally to a mixture of phthalates did not show changes in juvenile weight (PND21), but weight tended to increase in adulthood, especially at the dose of 200 µg/kg/day (Barakat *et al.*, 2019). These data reinforce the hypothesis that the metabolic changes resulting from these exposures may manifest later in life. Regarding testicular weight, the literature presents divergent results. Although some studies have not identified changes in this parameter after exposure to phthalates, nanoplastics, or co-exposure to these contaminants (Jin *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2025), others have reported effects similar to those observed in the present study in PND 120, such as an increase in testicular weight in mice exposed for 12 weeks to 80 nm NPs (1 mg/L) (Gao *et al.*, 2023).

AGD is a sensitive marker of sexual differentiation that dependent on the action of testosterone and dihydrotestosterone. On PND1, an increase in AGD was observed in the T3 group compared to the CTRL group. On PND22, an increase in AGD was identified in the T3 and T4 groups compared to CTRL. These results may be related with changes in steroidogenic regulation (discussed below), especially by the increase in the *Srd5a1* expression in testis at PND22. Preputial separation is also used to assess the effects of endocrine disruptors on the puberty onset. This marker showed a delay in the T3 group compared to CTRL, in line with the findings of Zhao *et al.* (2023), who also reported delays in mice exposed to microplastics during pregnancy and lactation. Considering that this indicator of pubertal maturation is

dependent on androgenic activity, these results suggest that the reduction in androgen receptor gene expression observed in the same group may be associated with lower tissue responsiveness to androgens, contributing to the delay observed.

Regarding the histological findings, spermatocyte apoptosis in pachytene showed an increase in the T5 group compared to CTRL at PND22. Between PND18 and 26, there is an apoptotic wave in spermatocytes in pachytene, especially in stages VII and VIII, and this process regulated by proteins of the Bcl-2 family and by caspase-3 activation. This process is necessary to maintain the proper ratio between maturing germ cells and Sertoli cell (Jahnukainen *et al.*, 2004). However, the increase observed here in PND22 suggests an intensification of this mechanism, possibly exceeding physiological control or even serving as protection to prevent the error from propagating at this stage of meiosis; therefore, this could compromise spermatogenesis during adulthood. Thus, the hypothesis is raised that xenobiotics, such as the plastic pollutants studied in this model, may enhance the apoptosis of these cells.

At PND120, testicular organogenesis is complete, with all stages of the seminiferous epithelium cycle present and Sertoli and Leydig cell proliferation having ceased. Parameters such as tubular diameter and germinal epithelium height may reflect its integrity; a reduction may indicate a decrease in germ cells and Sertoli cells (Mehranjani *et al.*, 2009). In this study, morphometric evaluation demonstrated a significant reduction in the seminiferous tubule's diameter in the T3 group and a reduction in germinal epithelium height in all exposed groups compared to the CTRL. Furthermore, there was a reduction in the number of Sertoli Cell cells in T2, T3, T4, and T5 groups, and in the Leydig cell count in the T4 and T5 groups compared to to the CTRL. It is known that phthalate-induced testicular toxicity results largely from multiple lesions in the Sertoli cell and Leydig cell, whose integrity is important for steroidogenesis, maintenance of the BTB, and sperm production (Li; Spade, 2021; Li *et al.*, 2021; Nikolic *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023; Grillo *et al.*, 2024). It is suggested that the observed

changes may be related to apoptosis induced by oxidative stress or inhibition of proliferation during critical windows of development, when these cells are mitotically active in the gestational period, period in which they were exposed (Zhang *et al.*, 2017).

Another mechanism potentially involved in the deleterious effects found in this study is oxidative stress. At physiological levels, ROS regulate germ cell differentiation and spermatogenesis progression, being necessary for normal reproductive function (Aitken *et al.*, 2014). However, exposure to environmental toxicants can disrupt the pro-oxidant/antioxidant balance, favoring the onset of oxidative stress (Saradha; Mathur, 2006). During prepuberty, there was an imbalance in the antioxidant system, which may have contributed to the increase in spermatocyte apoptosis observed in the T5 group compared to CTRL. In adulthood, this condition persisted and evolved into oxidative stress, characterized by the depletion of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in both co-exposure groups, in addition to increased lipid peroxidation in the T4 group compared to CTRL. This intensification is consistent with the damage observed at this age, including a reduction in Sertoli cell and Leydig cell, histopathological changes, and dysregulation of genes associated with cell junctions.

The cytotoxicity of NPs has been attributed, in large part, to their high capacity for cell penetration and interaction with proteins and DNA, which favors excessive ROS generation (Banerjee; Shelver, 2021). Studies in pubertal mice showed a reduction in SOD and glutathione peroxidase (GP-x), increased lipid peroxidation, and activation of toxic responses, including apoptosis via BAX/BCL2 and caspase 3, inflammation, as well as testicular morphological changes and damage to sperm (Xu *et al.*, 2023; Fang; Wang; Xiong, 2024). A similar pattern of changes in oxidative imbalance, associated with structural and functional changes in testicular cells, has been described for exposure to phthalates, such as DEHP, for example (Yang *et al.*, 2025).

Genes related to steroidogenesis and the maturation of Sertoli and Leydig cells were evaluated in the prepubertal period (PND22). An increase in *Amh* expression was observed in the T4 group compared to the CTRL. AMH, secreted by Sertoli cells, begins to decline progressively in pre-puberty and decreases dramatically after cell maturation in adulthood (Matuszczak *et al.*, 2013; Edelsztein *et al.*, 2018). Thus, the increase in this phase may indicate delayed maturation in the coexposed group. In addition, the reduction in *Ar* was observed only in the T3 group, corroborating Wakui *et al.* (2013), who also demonstrated a decrease of this gene and protein in offspring at 9, 14, and 17 weeks after maternal exposure to DBP (100 mg/kg/day, GD12–21) (Wakui *et al.*, 2013), which may lead to lower tissue responsiveness to androgens.

Furthermore, at PND22, increased expression of *Srd5a1* was observed in the T1, T2, T3, and T4 groups compared to the CTRL. SRD5A1 converts testosterone into dihydrotestosterone (DHT), a more potent androgen, and is naturally highly expressed in the prepubertal phase, when Leydig cells are still immature, decreasing after differentiation to the adult phenotype (Penning; Covey, 2024). Environmental contaminants can modulate this pathway: DEHP has been described as capable of reducing serum testosterone through hypothalamic-pituitary-testicular axis dysfunction and increasing 5 α -reductase activity in Leydig cells mediated by the ERK pathway (Ha *et al.*, 2016), while polystyrene microplastics have been shown to promote oxidative stress and activate the PERK–EIF2 α –ATF4–CHOP pathway, which positively regulates SRD5A2, intensifying testosterone metabolism and resulting in hormonal decline (Qu *et al.*, 2024).

Although no significant changes in plasma testosterone were observed at the ages evaluated, the increase in *Srd5a1* expression suggests a local modulation of androgen metabolism in the testis. Considering that DHT is involved in the differentiation processes of the external genitalia (Fischer *et al.*, 2024), this change in gene expression may be associated

with the observed increase of AGD in our results. However, this interpretation should be made with caution, since DHT was not administered in this study.

The integrity of the BTB depends on the stability of tight junctions between Sertoli cells, which create a specialized microenvironment essential for spermatogenesis and restrict the passage of undesirable substances (Mruk; Cheng, 2015). In this study, a reduction in *Tjp1* (ZO-1) expression was observed in both of the coexposed groups, indicating possible instability in the zona occludens between Sertoli cells. In contrast, the group exposed to the highest dose of phthalates showed increased *Ocln* expression, possibly as a compensatory mechanism aimed at preserving barrier integrity. Similar findings were reported in Sertoli cells isolated from rats exposed to the DBP metabolite, in which doses of 150 and 600 µmol/L altered the protein expression of ZO-1 and occludin. Alterations in these proteins have been associated with BTB permeability dysfunction and have been described in the testes of infertile men (Chiba *et al.*, 2012).

We acknowledge that this study has limitations, notably, the lack of additional plasma hormone analyses limited the assessment of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis, as well as of some sperm parameters at adulthood. Nevertheless, our findings demonstrate clear testicular alterations resulting from maternal exposure to plastic waste, revealing different dysregulated structural and molecular mechanisms both in early life and in adulthood. These results reinforce the effects of reproductive programming and suggest a potential long-term impairment of fertility.

5. CONCLUSION

Co-exposure to nanoplastics and phthalates, especially to the lower dose of the phthalate mixture, significantly intensified reproductive toxicity compared to isolated exposures, evidenced by a reduction in the number of Sertoli and Leydig cells, as well as by

619 morphometric and histopathological alterations and increased spermatocyte apoptosis. These
620 effects may be associated with the induction of oxidative stress observed in this study and
621 impairment of the blood-testis barrier, with a potential negative impact on spermatogenesis
622 and, consequently, on male fertility. Furthermore, the alterations detected in the pre-pubertal
623 period were exacerbated in adulthood, indicating that exposure during critical periods of
624 development may trigger persistent and progressive adverse effects throughout life.

6. REFERENCES

- AITKEN, R. et al. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 31, 2014.
- AMEREH, F. The emerging risk of exposure to nano(micro)plastics on endocrine disturbance and reproductive toxicity: from a hypothetical scenario to a global public health challenge. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114158, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114158>.
- ASSESSMENT, Reproductive Toxicity Risk. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment [em linha]. out. 1996 Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-11/documents/guidelines_repro_toxicity.pdf>. Acesso em: out. 2025
- BANERJEE, A.; SHELVER, W. L. Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review. **Science of The Total Environment**, v. 755, p. 142518, fev. 2021.
- BARAKAT, R. *et al.* Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts testicular steroidogenesis in adult male mice. **Environmental Research**, v. 172, p. 194-201, maio 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.017>.
- BARKER, D.J.P I *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 334, n. 8663, p. 577-580, 1989. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90710-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90710-1).
- BAUMANS, V. The welfare of laboratory mice. **The Welfare of Laboratory Animals**, p. 119–152, 2007.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 29 jan. 1976.
- CAO, X. Phthalate Esters in Foods: sources, occurrence, and analytical methods. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 21-43, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00093.x>.
- CARRARA, I. M. *et al.* Looking beyond the skin: Cutaneous and systemic oxidative stress in UVB-induced squamous cell carcinoma in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 195, p. 17–26, jun. 2019.
- CARY, C. M. *et al.* Ingested Polystyrene Nanospheres Translocate to Placenta and Fetal Tissues in Pregnant Rats: Potential Health Implications. **Nanomaterials**, v. 13, n. 4, p. 720, 1 jan. 2023.
- CHEN, G.; FENG, Q.; WANG, J. Mini-review of microplastics in the atmosphere and their risks to humans. **Science of The Total Environment**, v. 703, p. 135504, fev. 2020.
- CHIBA, K. *et al.* Inhibition of Claudin-11 and Occludin Expression in Rat Sertoli Cells by doulMono-(2-Ethylhexyl) Phthalate Through p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **Andrology**, v. 33, n. 3, p. 368–374, 6 maio 2012.

664 COSTA, J. P. Micro- and nanoplastics in the environment: research and policymaking.
 665 **Current Opinion In Environmental Science & Health**, v. 1, p. 12-16, 2018.
 666 <http://dx.doi.org/10.1016/j.coesh.2017.11.002>.

667 DOULL, J. *et al.* A Cancer Risk Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate: application of
 668 the new u.s. epa risk assessment guidelines. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**,
 669 v. 29, n. 3, p. 327-357, jun. 1999. <http://dx.doi.org/10.1006/rtp.1999.1296>.

670 EDELSZTEIN *et al.* Androgens downregulate anti-Müllerian hormone promoter activity in
 671 the Sertoli cell through the androgen receptor and intact steroidogenic factor 1 sites†. **Biology**
 672 **of reproduction**, v. 99, n. 6, p. 1303–1312, 7 jul. 2018.

673 ERTHAL, R. P. *et al.* Exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal
 674 periods impairs testicular and sperm parameters in rats: Role of oxidative stress and
 675 testosterone. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), v. 96, p. 17–26, set. 2020.

676 FANG, Q.; WANG, C.; XIONG, Y. Polystyrene microplastics induce male reproductive
 677 toxicity in mice by activating spermatogonium mitochondrial oxidative stress and apoptosis.
 678 **Chemico-biological interactions**, v. 396, p. 111043–111043, 1 jun. 2024.

679 FAVARETO, A. P. A. *et al.* Paternal treatment with cisplatin impairs reproduction of
 680 adult male offspring in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 425-433, dez.
 681 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.10.003>.

682 FEDERICI, G.; SHAW, B.; HANDY, R. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to
 683 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological
 684 effects. *Aquatic Toxicology*, v. 84, n. 4, p. 415–430, 30 out. 2007.

685 FERGUSON, K. K. *et al.* Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation
 686 to sex hormones and puberty in boys. **Reproductive Toxicology**, v. 47, p. 70-76, 2014.
 687 <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.06.002>.

688 FISCHER M. P. *et al.* Longitudinal Evaluation of Fetal and Infant AGD in Healthy
 689 Children: Association With Penile Size, Testosterone, and DHT. **The Journal of Clinical**
 690 **Endocrinology & Metabolism**, v. 109, n. 12, p. 3087–3095, dec.
 691 2024, <https://doi.org/10.1210/clinem/dgae342>.

692 FREITAS T. *et al.* Prenatal exposure to a mixture of different phthalates increases the risk of
 693 mammary carcinogenesis in F1 female offspring. **Food and chemical toxicology**, v. 156, p.
 694 112519–112519, 1 out. 2021.

695 GALLAVAN, R. H. *et al.* Interpreting the toxicologic significance of alterations in
 696 anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body
 697 weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.

698 GAO, L. *et al.* The male reproductive toxicity after nanoplastics and microplastics exposure:
 699 Sperm quality and changes of different cells in testis. **Ecotoxicology and environmental**
 700 **safety**, v. 267, p. 115618–115618, 1 nov. 2023.

701 GRILLO, G. *et al.* Polystyrene microplastics impair the functions of cultured mouse Leydig
 702 (TM3) and Sertoli (TM4) cells by inducing mitochondrial-endoplasmic reticulum damage.
 703 **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 274, p. 116202, 12 mar. 2024.

704 HA, M. *et al.* Di-(2-ethylhexyl) phthalate inhibits testosterone level through disturbed
 705 hypothalamic–pituitary–testis axis and ERK-mediated 5 α -Reductase 2. **Science of The Total**
 706 **Environment**, v. 563-564, p. 566–575, 1 set. 2016.

707 HOUSSINI, K.; LI, J.; TAN, Q. Complexities of the global plastics supply chain revealed in
 708 a trade-linked material flow analysis. **Communications Earth & Environment**, v. 6, n. 1,
 709 10 abr. 2025.

710 HSU, P.-C. *et al.* Transgenerational Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate on Anogenital
 711 Distance, Sperm Functions and DNA Methylation in Rat Offspring. **International Journal**
 712 **of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4131, 16 abr. 2021.

713 HU, L.; ZHAO, Y.; XU, H. Trojan horse in the intestine: A review on the biotoxicity of
 714 microplastics combined environmental contaminants. **Journal of Hazardous Materials**, v.
 715 439, p. 129652, out. 2022.

716 HUANG, G. *et al.* Evaluation of nanoplastics toxicity in the soil nematode *Caenorhabditis*
 717 *elegans* by iTRAQ-based quantitative proteomics. **Science of The Total Environment**, v.
 718 862, p. 160646, 1 mar. 2023.

719 HUANG, T. *et al.* Maternal exposure to polystyrene nanoplastics during gestation and
 720 lactation induces hepatic and testicular toxicity in male mouse offspring. **Food and**
 721 **Chemical Toxicology**, v. 160, p. 112803, fev. 2022.

722 JAHNUKAINEN *et al.* Increased Apoptosis Occurring During the First Wave of
 723 Spermatogenesis Is Stage-Specific and Primarily Affects Midpachytene Spermatocytes in the
 724 Rat Testis1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 290–296, 1 fev. 2004.

725 JIN, H. *et al.* Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. **Journal**
 726 **of Hazardous Materials**, v. 401, p. 123430, jan. 2021.

727 KATSIKANTAMI, I. *et al.* Phthalate metabolites concentrations in amniotic fluid and
 728 maternal urine: cumulative exposure and risk assessment. **Toxicology Reports**, v. 7, p.
 729 529-538, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.04.008>.

730 KAUR, G.; THOMPSON, L. A.; DUFOUR, J. M.. Sertoli cells – Immunological sentinels of
 731 spermatogenesis. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, v. 30, p. 36-44, 2014.
 732 <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.011>.

733 KAVLOCK, R. *et al.* NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction:
 734 phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-
 735 ethylhexyl) phthalate. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 5, p. 529–653, set. 2002.

736 LEE, J.-H. *et al.* Phthalate plasticizer decreases the prion-like protein doppel essential for
 737 structural integrity and function of spermatozoa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**,
 738 v. 246, p. 114159, nov. 2022.

739 LEWIS, E. M. *et al.* Sexual maturation data for crl sprague-dawley rats: criteria and
 740 confounding factors. **Drug And Chemical Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 437-458, jan. 2002.
 741 <http://dx.doi.org/10.1081/dct-120014794>.

742 LI, H.; SPADE, D. J. Environmental exposures, fetal testis development and function:
 743 phthalates and beyond. **Reproduction**, jul. 2021.

744 LI, S. *et al.* Polystyrene microplastics induce blood–testis barrier disruption regulated by the
 745 MAPK-Nrf2 signaling pathway in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v.
 746 28, n. 35, p. 47921–47931, 25 abr. 2021.

747 LIU, H. *et al.* Co-exposure to polystyrene microplastics and microcystin-LR aggravated male
 748 reproductive toxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 181, p. 114104–114104, 1
 749 nov. 2023.

750 LIU, Y. *et al.* Exposure to polystyrene nanoplastics impairs sperm metabolism and pre-
 751 implantation embryo development in mice. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**,
 752 v. 13, 28 fev. 2025.

753 LIU, Y. *et al.* Phthalate metabolites in breast milk from mothers in Southern China:
 754 occurrence, temporal trends, daily intake, and risk assessment. **Journal Of Hazardous**
 755 **Materials**, v. 464, p. 132895, 2024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132895>.

756 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using
 757 Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408,
 758 dez. 2001. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

759 LUÍS, C. *et al.* Comprehensive Insight from Phthalates Occurrence: from health outcomes
 760 to emerging analytical approaches. **Toxics**, v. 9, n. 7, p. 157, 2021.
 761 <http://dx.doi.org/10.3390/toxics9070157>.

762 LUO, Q. *et al.* Microplastics as an emerging threat to human health: An overview of
 763 potential health impacts. **Journal of Environmental Management**, v. 387, p. 125915, jul.
 764 2025.

765 MA, T. *et al.* Effects of In Utero Exposure to Di-n-Butyl Phthalate on Testicular
 766 Development in Rat. **International Journal of Environmental Research and Public**
 767 **Health**, v. 14, n. 10, p. 1284, 24 out. 2017.

768 MA, T. *et al.* Polystyrene nanoplastics aggravated dibutyl phthalate-induced blood-testis
 769 barrier dysfunction via suppressing autophagy in male mice. **Ecotoxicology and**
 770 **Environmental Safety**, v. 264, p. 115403–115403, 31 ago. 2023.

771 MATUSZCZAK, E. *et al.* Serum AMH in Physiology and Pathology of Male Gonads.
 772 **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

773 MEHRANJANI M. S. *et al.* Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure
 774 in rats treated with para-nonylphenol. **Asian Journal of Andrology**, v. 11, n. 4, p. 508–516,
 775 29 jun. 2009.

776 MITAL, P.; HINTON, B. T.; DUFOUR, J. M.. The Blood-Testis and Blood-Epididymis
 777 Barriers Are More than Just Their Tight Junctions1. **Biology Of Reproduction**, v. 84, n. 5, p.
 778 851–858, 2011. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.110.087452>.

779 MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and
 780 Regulation. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 5, p. 564–591, 10 set. 2015.

781 NIKOLIC, S. *et al.* Orally administered fluorescent nanosized polystyrene particles affect cell
 782 viability, hormonal and inflammatory profile, and behavior in treated mice. **Environmental**
 783 **Pollution**, v. 305, p. 119206–119206, 1 jul. 2022.

784 OECD, **Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060**. 2022. Disponível em:
 785 <https://doi.org/10.1787/aa1edf33-en>. Acesso em: 01 out. 2025.

786 PENNING, T. M.; COVEY, D. F. 5 β -Dihydrosteroids: Formation and Properties.
 787 **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 16, p. 8857, 14 ago. 2024.

788 PICUT, C. A. *et al.* Postnatal Development of the Testis in the Rat. **Toxicologic**
 789 **Pathology**, v. 43, n. 3, p. 326-342, 2014. <http://dx.doi.org/10.1177/0192623314547279>.

790 Plastics – the fast Facts 2023 • Plastics Europe. Available in:
 791 <<https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023>>.

792 POMA, A. *et al.* In Vitro Genotoxicity of Polystyrene Nanoparticles on the Human
 793 Fibroblast Hs27 Cell Line. **Nanomaterials**, v. 9, n. 9, p. 1299, 11 set. 2019.

794 QU, J. *et al.* Polystyrene microplastics trigger testosterone decline via GPX1. **The Science of**
 795 **The Total Environment**, v. 947, p. 174536–174536, 1 out. 2024.

796 RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of
 797 glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature**
 798 **Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, dez. 2006. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.378>.

799 ROSENFELD, C. S.. Bisphenol A and phthalate endocrine disruption of parental and
 800 social behaviors. **Frontiers In Neuroscience**, v. 9, 2015.
 801 <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00057>.

802 SARADHA, B.; MATHUR, P. P. Effect of environmental contaminants on male
 803 reproduction. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 34–41, jan.
 804 2006.

805 SCARANO, W. R. *et al.* Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture During
 806 Prostate Development Induces MicroRNA Upregulation and Transcriptome Modulation in
 807 Rats. **Toxicological Sciences**, v. 171, n. 1, p. 84-97, 2019.
 808 <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfz141>.

809 SEKARAN, S.; JAGADEESAN, A. In Utero Exposure to Phthalate Downregulates
 810 Critical Genes in Leydig Cells of F1 Male Progeny. **Journal Of Cellular Biochemistry**,
 811 v. 116, n. 7, p. 1466-1477, 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.25108>.

812 SENTHILKUMAR, M.; AMARESAN, N.; SANKARANARAYANAN, A. Plant-
 813 Microbe Interactions. **Springer Protocols Handbooks**, 2021.
 814 <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0>.

815 SERRANO, S. E. *et al.* Phthalates and diet: a review of the food monitoring and
 816 epidemiology data. **Environmental Health**, v. 13, n. 1, 2 jun. 2014.

817 SIERVO, G. E. M. L. *et al.* Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol:
 818 influence of lipid peroxidation but not testosterone. **Toxicology**, v. 330, p. 1-8, abr. 2015.
 819 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2015.01.016>.

820 SPADE, D. J. *et al.* Di-n-Butyl Phthalate Induces Multinucleated Germ Cells in the Rat Fetal
 821 Testis Through a Nonproliferative Mechanism1. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 5, 1 nov.
 822 2015.

823 VAN DER AAR, E. M. et al. Structure-activity relationships for chemical and glutathione S-
 824 transferase-catalysed glutathione conjugation reactions of a series of 2-substituted 1-chloro-
 825 4-nitrobenzenes. **The Biochemical journal**, v. 320 (Pt 2), n. Pt 2, p. 531–40, jan. 1996.

826 WAKUI, S. *et al.* Effects of in Utero Exposure to Di(n-butyl) Phthalate for Estrogen
 827 Receptors α , β , and Androgen Receptor of Leydig Cell on Rats. **Toxicologic Pathology**, v.
 828 42, n. 5, p. 877–887, 25 set. 2013.

829 WANG, J. *et al.* Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces prepubertal testicular injury through
 830 MAM-related mitochondrial calcium overload in Leydig and Sertoli cell apoptosis.
 831 **Toxicology**, v. 509, p. 153956, 2024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2024.153956>.

832 WATKINS, D. J. *et al.* In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in
 833 relation to female sexual maturation. **Environmental Research**, v. 134, p. 233-241, 2014.
 834 <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.010>.

835 WILLSON, C. J. Phthalate Toxicity in Rats and Its Relation to Testicular Dysgenesis
 836 Syndrome in Humans. **Toxicologic Pathology**, v. 49, n. 8, p. 1416–1424, 23 set. 2021.

837 WILSON, V. S. *et al.* Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with
 838 reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. **Toxicology Letters**, v. 146, n. 3, p. 207–
 839 215, fev. 2004.

840 XU, W. *et al.* Oral exposure to polystyrene nanoplastics reduced male fertility and even
 841 caused male infertility by inducing testicular and sperm toxicities in mice. **Journal of**
 842 **Hazardous Materials**, v. 454, p. 131470, 15 jul. 2023.

843 YANG, L. *et al.* DEHP-mediated oxidative stress leads to impaired testosterone synthesis in
 844 Leydig cells through the cAMP/PKA/SF-1/StAR pathway. **Environmental Pollution**, v. 366,
 845 p. 125503, 8 dez. 2024.

846 ZHANG, L. *et al.* Protective Effects of Genistein against Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate-
 847 Induced Oxidative Damage in Prepubertal Sertoli Cells. **BioMed Research International**, v.
 848 2017, p. 1–12, 1 jan. 2017.

849 ZHAO, T. *et al.* Prenatal and postnatal exposure to polystyrene microplastics induces testis
 850 developmental disorder and affects male fertility in mice. **Journal of Hazardous Materials**,
 851 v. 445, p. 130544, mar. 2023.

852 ZHOU, C.; GAO, L.; FLAWS, J. A.. Prenatal exposure to an environmentally relevant
 853 phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. **Toxicology And Applied**
 854 **Pharmacology**, v. 318, p. 49-57, mar.
 855 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2017.01.010>

CONCLUSÃO GERAL

De forma integrada, os resultados dos dois capítulos demonstram que a coexposição gestacional, bem como a coexposição gestacional e lactacional, a ftalatos e nanoplasticos, especialmente na menor dose de ftalatos (T4), modulou de maneira significativa a expressão de mRNAs fetais e pré-púberes associados à esteroidogênese e aos processos de desenvolvimento e maturação testicular. Essas alterações moleculares fornecem uma base mecanística consistente para os desfechos fenotípicos observados, incluindo o aumento da distância anogenital. Adicionalmente, foram conduzidas mais análises nos descendentes expostos durante os períodos gestacional e lactacional. Os principais achados incluíram redução no número de células de Sertoli e de Leydig, prejuízos morfométricos e histopatológicos testiculares, aumento da apoptose de espermátócitos e desregulação do sistema oxidante/antioxidante, indicando comprometimento da integridade da barreira hemato-testicular. Notavelmente, esses efeitos tornaram-se mais pronunciados com o avanço da idade, atingindo maior magnitude na fase adulta, o que sugere que a exposição durante janelas críticas do desenvolvimento pode desencadear alterações progressivas e duradouras ao longo da vida. Em conjunto, esses achados reforçam que exposições ambientais combinadas, mesmo em baixas doses, podem resultar em efeitos reprodutivos mais severos do que aqueles observados isoladamente, em consonância com o conceito de DOHaD.

875 APPENDIX 1: List of primers used in RT-qPCR

876 **Table 1.** Sequence of the primers used for the RT-qPCR analysis, containing the access codes of the
 877 analyzed targets (GenBank).

Gene	Reference Code (NCBI)	Primer Sequence (5'-3')
<i>Gapdh</i> (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	NM_017008.4	F: TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA R: TATGAGACGAGGCTGGCACT
<i>Ar</i> (Androgen receptor)	NM_012502.2	F: AAAAGAGCTGCGGAAGGGAA R: CATTTCCGGAGACGACACGA
<i>Amh</i> (Anti-mullerian hormone)	NM_012902.2	F: TCAACCAAGCAAAGAAGGTGC R: AGCGGGAATCAGAGCCAAAC
<i>Hsd17b1</i> (hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 1)	NM_012851.2	F: TCTTTGCCCACTATCAGCGT R: AGTCAAGAAGAGCTCCGTCA
<i>Srd5a1</i> (Steroid 5-alpha-reductase)	NM_017070.3	F: GATACAAGATACCCAGGGGAGG R: CTCCACGAGCTCCCCAAAAT
<i>Tjp1</i> (tight junction protein 1)	NM_001106266.1	F: GCCAGCTTTAAGCCTCCAGA R: TGGCTTCGCTTGAGGTTTC
<i>Ocln</i> (occludin)	NM_031329.3	F: GCCGGATGAATTCAAACCCA R: GTGCATCTCTCCGCCATACA
<i>Tgfb2</i> (transforming growth factor beta 2)	NM_031131.2	F: CACTTCCCCTCCGAAACTGTCTR: R: CACTGAGCCAGAGGATGTTGT
<i>Ins13</i> (insulin like 3)	NM_053680.2	F: TCTGTGTCCCCACTGAAGGA R: TGTGGTCCTTGTTTCTGGG



Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO : EMENDA v08/11/2025

Certificamos que a EMENDA (versão de 08/11/2025) da proposta intitulada "Repercussões da exposição materna a nanoplasticos e ftalatos: aspectos maternos e susceptibilidade a oncogênese prostática em ratos", CEUA nº 1174020523 (ID 014774), sob a responsabilidade de **Wellerson Rodrigo Scarano e equipe; Luis Fernando Barbisan; Natalia Magosso; Patrick Vieira de Souza; Vanessa Aguiar Rocha; Vanessa de Cássia Martins Pires** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) em 13/11/2025.

Pedido apresentado à CEUA: Solicito a inclusão da aluna Vanessa de Cássia Martins Pires na equipe do projeto. Ela só analisará o material que já foi coletado pelo Prof. Barbisan.

Considerações da CEUA: Inclusão aprovada.

Término previsto: 12/2026

Origem: CEMIB - UNICAMP

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 90 a 120 dias

Quantidade mantida: -0

Linhagem: Sprague Dawley

Peso: 200 a 250 g

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Ratos heterogênicos	Machos e Fêmeas	694	0

Botucatu, 09 de janeiro de 2026

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

Prof. Assoc. Luis Fernando Barbisan
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

