

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
dissertação será disponibilizado
somente a partir de 07/01/2028

.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Resíduos plásticos e toxicologia reprodutiva: abordagens
in vivo e *in vitro* dos aspectos reprodutivos femininos**

Patrick Vieira de Souza

Orientador: Prof. Titular Wellerson Rodrigo Scarano

BOTUCATU – SP

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Resíduos plásticos e toxicologia reprodutiva: abordagens
in vivo e *in vitro* dos aspectos reprodutivos femininos**

Patrick Vieira de Souza

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.

Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

BOTUCATU – SP

2026

S729r Souza, Patrick Vieira
Resíduos plásticos e toxicologia reprodutiva:
abordagens in vivo e in vitro dos aspectos
reprodutivos femininos / Patrick Vieira Souza. --
Botucatu, 2026
134 p.

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

1. Nanoplásticos. 2. Ftalatos. 3. Coexposição. 4.
in vitro. 5. DOHaD. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Impacto potencial desta pesquisa:

A pesquisa investiga como a exposição a ftalatos e nanoplasticos, em diferentes janelas da biologia reprodutiva feminina, afeta o desenvolvimento e a função ovariana em roedores. Os resultados podem esclarecer mecanismos de programação reprodutiva, revelar vias de ação desses contaminantes e ampliar a compreensão sobre os impactos dos polímeros plásticos na saúde reprodutiva feminina ao longo da vida. Além disso, o estudo pode subsidiar políticas públicas voltadas à regulação da produção e descarte de plásticos, bem como fortalecer a conscientização da população sobre os riscos associados ao uso inadequado desses materiais.

Potential impact of this research:

The research investigates how exposure to phthalates and nanoplastics, at different windows of female reproductive biology, affects ovarian development and function in rodents. The results may clarify mechanisms of reproductive programming, reveal pathways of action of these contaminants, and expand the understanding of the impacts of plastic polymers on female reproductive health across the lifespan. In addition, the study may support public policies aimed at regulating the production and disposal of plastics, as well as strengthen public awareness of the risks associated with the improper use of these materials.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Resíduos plásticos e toxicologia reprodutiva: abordagens *in vivo* e *in vitro* dos aspectos reprodutivos femininos

AUTOR: PATRICK VIEIRA DE SOUZA

ORIENTADOR: WELLERSON RODRIGO SCARANO
ORIENTADOR DE MOBILIDADE: JODI FLAWS (Internacional)

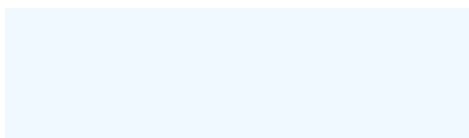
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia Celular Estrutural e Funcional pela Comissão Examinadora:

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

Profa. Dra. FLAVIA KARINA DELELLA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Prof. Dr. JORGE WILLIAN FRANCO DE BARROS (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências da Saúde - UFR

Botucatu, 07 de janeiro de 2026.



Renan Codeco da Silva

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a **Deus**, que me proporcionou tantas oportunidades desde o início e continua me guiando pelo melhor caminho. Em seguida, agradeço à minha família. À minha mãe, **Luciane Vieira de Souza**, que me demonstrou a importância de ser forte, nunca desistir, importar-se com o próximo e realizar todas as coisas com muita dedicação e alegria. Ao meu pai, **Ademir Vieira de Souza**, que sempre me ensinou valores valiosos, incluindo a importância de fazer todas as coisas com comprometimento e seriedade. À minha irmã, **Sthefany Vieira de Souza**, minha companheira caçula, que é uma das minhas maiores admiradoras, assim como eu sou dela. Agradeço à minha namorada, **Bruna de Assis Vidal**, que me mostra, todos os dias, as razões pelas quais a vida é uma experiência única, leve, dançante e com um final feliz. Você tem sido meu alicerce desde sempre, me dando suporte e sendo companheira em todo esse processo. Sem você, não teria sido possível concluir esta dissertação.

Agradeço aos meus avós; mesmo à distância, sei que todos zelam e torcem pela minha jornada. Em especial, agradeço a **Bertolina do Amaral**, que se foi cedo, mas deixou marcas que moldam quem eu sou em todos os âmbitos da minha vida.

Ao meu orientador e mentor, **Wellerson Rodrigo Scarano**, agradeço por me acolher desde o início no laboratório, possibilitando a realização de sonhos sempre com muita confiança, leveza e inspiração.

À **Ariana Musa de Aquino**, agradeço pela orientação durante minha iniciação científica, momento em que despertei o amor pela carreira acadêmica. Você sempre conduziu tudo de forma dedicada, inspirando-me a um dia ser próximo do que você é.

Ao **LabDECA**, agradeço a cada companheiro de trabalho ao longo desses anos. Em especial, gostaria de agradecer a **Natália Magosso**, uma amiga que participou da minha jornada acadêmica desde a iniciação científica, sempre disposta a gerar hipóteses e responder a cada uma delas. Com você, pude construir uma amizade na qual posso contar com ajuda e cobrança de forma sincera. Agradeço à **Mirella Franco** por ter sido uma adição crucial ao laboratório e como amiga para qualquer situação; obrigado por escolher a gente. Agradeço ao **Matheus Fioretto**, sua amizade foi fundamental para manter a inspiração durante o mestrado, seu amor e dedicação à ciência me inspiram e fazem com que eu me proponha a ser melhor sempre. Agradeço a todos os amigos que construí no departamento, especialmente aos alunos do **DBMOL**. Agradeço a **todos os ICs** do LabDECA durante esse período;

foi sempre um prazer ensinar e aprender com cada um deles, especialmente **Gabriel Aquino Maia** e **Victória Pinha**, sem os quais essa experiência não teria sido a mesma. Ao LabDECA, todo o meu amor e gratidão!

À todos os meus amigos de infância, principalmente **Enzo Bonfim** e **Henrique Martino**, que estão comigo desde sempre, sempre compartilhando momentos incríveis ou oferecendo um ombro amigo. Sem vocês, não teria chegado até aqui.

À **República Abre Lacre** e a todos os moradores que passaram pela minha jornada. Com eles, aprendi valores que não têm preço, desenvolvi habilidades de comunicação e relacionamento interpessoal, compreendi conceitos sociais e a importância científica em diversas áreas. Além disso, construí amizades eternas.

Ao laboratório da professora **Jodi Anne Flaws**, agradeço por me acolherem da melhor forma possível, possibilitando minha evolução em diversas dimensões, além da construção de grandes amizades. Em especial, agradeço a **Ramsés Santacruz-Márquez** e **Mary J. Laws**, sem vocês, esse processo teria sido muito mais difícil.

Agradeço a todos os técnicos administrativos e funcionários da UNESP, especialmente do Departamento de Morfologia: **Keila Emílio**, **Ricardo Teixeira** e **José Eduardo**, sempre dispostos a ajudar com tudo. Um agradecimento mais que especial à funcionária **Paula**, responsável pela limpeza do departamento, mesmo em meio à bagunça que frequentemente fazemos.

Aos **animais de laboratório**, minha gratidão e respeito.

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 2024/01724-7 e 2024/21926-3**, agradeço o apoio financeiro durante a realização do mestrado.

Por fim, acredito que somos fruto da relação com os demais. Assim como uma célula isolada responde a estímulos do seu microambiente, o ser humano é moldado por interações e experiências ao longo da vida. Respondemos às experiências e aos ensinamentos da mesma forma que células respondem a sinalizações externas; Apresentamos alterações comportamentais, assim como modificações epigenéticas; e possuímos integridade e função, pois também contribuimos para o ambiente em que estamos inseridos, seja ele familiar, comunitário ou social. Ademais, mantenho-me vivo enquanto minha integridade, minha influência e minha função forem necessárias para contribuir com um todo.

Resumo

A produção plástica cresce continuamente, ampliando a preocupação com seus resíduos no ambiente e na saúde humana. Os nanoplásticos (NPs), partículas derivadas da degradação do plástico, apresentam capacidade de internalização celular e de causar efeitos adversos em sistemas biológicos. Os ftalatos, aditivos plásticos amplamente utilizados, atuam como desreguladores endócrinos, perturbando a homeostase hormonal. A exposição a contaminantes ambientais durante janelas críticas do desenvolvimento pode programar alterações duradouras na saúde reprodutiva, conforme o conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD). Nesse contexto, esta dissertação avaliou os efeitos da exposição a nanoplásticos de poliestireno (PS-NPs) e ftalatos, de forma isolada e combinada, sobre a função ovariana, utilizando diferentes modelos experimentais e períodos de exposição. Inicialmente, foram analisados os efeitos diretos desses contaminantes em folículos antrais de camundongos cultivados *in vitro*, demonstrando impacto no crescimento folicular e alterações na expressão de genes relacionados à apoptose (*Casp3*, *Casp8* e *Bcl2*) e ao balanço oxidativo (*Cat*, *Nrf2* e *Gpx1*), com a coexposição também afetando receptores hormonais (*Esr2* e *Ar*). Em seguida, foram avaliados os efeitos da exposição direta e da coexposição durante o estabelecimento da reserva ovariana em ovários neonatais de camundongos *in vitro*. A coexposição impactou genes envolvidos na regulação do ciclo celular (*Ccnd2*, *Cdk6* e *Cdkn1c*), balanço oxidativo (*Cat*, *Gpx1* e *Hmox1*), sinalização estrogênica (*Esr2*), desenvolvimento folicular (*Amh*) e atividade inflamatória e lisossomal (*Ccl2* e *Lamp1*), especialmente na dose ambientalmente relevante, sugerindo comprometimento da manutenção da reserva ovariana. Por fim, a exposição gestacional e lactacional a PS-NPs, ftalatos e suas coexposições promoveu alterações persistentes no desenvolvimento reprodutivo da prole feminina, redução dos níveis séricos de estradiol na idade adulta e reprogramação do proteoma ovariano, caracterizada por disfunção mitocondrial, remodelação do citoesqueleto, desbalanço do metabolismo energético e ativação de vias de resposta ao estresse oxidativo. Este estudo reforça a relevância da exposição a contaminantes plásticos como um fator de risco emergente para a saúde reprodutiva e destaca a importância de considerar exposições combinadas na avaliação de riscos ambientais.

Palavras-chave: Nanoplásticos; Ftalatos; Coexposição; *in vitro*; *in vivo*; DOHaD; Ovário.

Abstract

Plastic production continues to increase, raising concerns about plastic-derived residues in the environment and human health. Nanoplastics (NPs), particles generated from plastic degradation, have the ability to be internalized and to induce adverse effects in biological systems. Phthalates, widely used plastic additives, act as endocrine disruptors and interfere with hormonal homeostasis. Exposure to environmental contaminants during critical developmental windows may program long-lasting alterations in reproductive health, as proposed by the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) concept. In this context, this dissertation evaluated the effects of exposure to polystyrene nanoplastics (PS-NPs) and phthalates, individually and in combination, on ovarian function, using different experimental models and exposure periods. Initially, the direct effects of these contaminants were assessed in mouse antral follicles cultured *in vitro*, demonstrating impaired follicular growth and altered expression of genes related to apoptosis (Casp3, Casp8, and Bcl2) and oxidative balance (Cat, Nrf2, and Gpx1), while co-exposure also affected hormonal receptors (Esr2 and Ar). Subsequently, the effects of direct exposure and co-exposure during the establishment of the ovarian reserve were evaluated in neonatal mouse ovaries cultured *in vitro*. Co-exposure affected genes involved in cell cycle regulation (Ccnd2, Cdk6, and Cdkn1c), oxidative balance (Cat, Gpx1, and Hmox1), estrogen signaling (Esr2), follicular development (Amh), and inflammatory and lysosomal activity (Ccl2 and Lamp1), particularly at the environmentally relevant dose, suggesting impairment of ovarian reserve maintenance. Finally, gestational and lactational exposure to PS-NPs, phthalates, and their co-exposures induced persistent alterations in female offspring reproductive development, reduced serum estradiol levels in adulthood, and reprogramming of the ovarian proteome, characterized by mitochondrial dysfunction, cytoskeletal remodeling, imbalance in energy metabolism, and activation of oxidative stress response pathways. This study reinforces the relevance of exposure to plastic-related contaminants as an emerging risk factor for reproductive health and highlights the importance of considering combined exposures in environmental risk assessment.

Keywords: Nanoplastics; Phthalates; Co-exposure; In vitro; In vivo; DOHaD; Ovary.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- ACADM:** Acil-CoA desidrogenase de cadeia média / Medium chain acyl-CoA dehydrogenase
- ACADS:** Acil-CoA desidrogenase de cadeia curta / Short chain acyl-CoA dehydrogenase
- ACAT1:** Acetil-CoA acetiltransferase 1 / Acetyl-CoA acetyltransferase 1
- ACTA1:** Actina alfa 1, músculo esquelético / Actin alpha 1, skeletal muscle
- ACTA2:** Actina alfa 2, músculo liso / Actin alpha 2, smooth muscle
- ACTB:** Actina beta / Actin beta
- ACTC1:** Actina alfa, músculo cardíaco 1 / Actin alpha cardiac muscle 1
- ACTG1:** Actina gama 1 / Actin gamma 1
- ACTG2:** Actina gama 2 / Actin gamma 2
- Amh:** Hormônio antimlleriano / Anti-Müllerian hormone
- ANOVA:** Análise de varincia / Analysis of variance
- ANXA2:** Annexina A2 / Annexin A2
- APOA1:** Apolipoprotena A1 / Apolipoprotein A1
- APOE:** Apolipoprotena E / Apolipoprotein E
- Ar:** Receptor de andrgeno / Androgen receptor
- ATP5F1A:** Subunidade alfa da ATP sintase / ATP synthase F1 subunit alpha
- Bax:** Proteína associada  BCL2 / BCL2 associated X protein
- BBzP:** Ftalato de butilbenzeno / Butylbenzyl phthalate
- Bcl2:** B-cell lymphoma 2 / B-cell lymphoma 2
- BSA:** Albumina sérica bovina / Bovine serum albumin
- Cat** – Catalase / Catalase
- Ccnd2** : Ciclin D2 / Cyclin D2
- Ccl2:** CCL2 (quimiocina) / C-C motif chemokine ligand 2
- Cdk6:** Quinase dependentes de ciclinas 6 / Cyclin-dependent kinase 6
- Cdkn1c:** Inibidor de quinase dependente de ciclina 1C / Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
- COX2:** Subunidade 2 da citocromo c oxidase / Cytochrome c oxidase subunit II
- COX4I1:** Subunidade 4 da citocromo c oxidase I1 / Cytochrome c oxidase subunit 4I1
- Cpt2:** Carnitina palmitoiltransferase 2 / Carnitine palmitoyltransferase 2
- CYP11A1:** Citocromo P450 família 11 subfamlia A membro 1 / Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1
- CYP17A1:** Citocromo P450 família 17 subfamlia A membro 1 / Cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1
- CYP19A1:** Citocromo P450 família 19 subfamlia A membro 1 / Cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol / 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DBP:** Dibutilftalato / Dibutyl phthalate
- DEHP:** Di(2-etilhexil) ftalato / Di(2-ethylhexyl) phthalate
- DEP:** Dietilftalato / Diethyl phthalate
- DEs:** Desreguladores endócrinos / Endocrine disruptors

DG: Genes diferencialmente expressos / Differentially expressed genes

DiBP: Diisobutilftalato / Diisobutyl phthalate

DiNP: Diisononilftalato / Diisononyl phthalate

DHEA: Deidroepiandrosterona / Dehydroepiandrosterone

DLS: Dispersão dinâmica de luz / Dynamic light scattering

DMSO : Dimetilsulfóxido / Dimethyl sulfoxide

DOHaD: Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença / Developmental Origins of Health and Disease

DPN: Dia pós-natal / Day post-natal

E2: Estradiol / Estradiol

EDCs: Produtos químicos desreguladores endócrinos / Endocrine-disrupting chemicals

ELISA: Ensaio de imunoabsorção ligado a enzimas / Enzyme-linked immunosorbent assay

EROs: Espécies reativas de oxigênio / Reactive oxygen species

Esr2: Receptor de estrogênio beta / Estrogen receptor beta

FBS: Soro fetal bovino / Fetal bovine serum

FPS-NPs: Nanoplásticos de poliestireno fluorescentes / Fluorescent polystyrene nanoplastics

FSH: Hormônio folículo-estimulante / Follicle-stimulating hormone

GOT1: Transaminase glutâmico-oxaloacética 1 / Glutamic-oxaloacetic transaminase 1

GOT2: Transaminase glutâmico-oxaloacética 2 / Glutamic-oxaloacetic transaminase 2

Gpx1: Glutathione peroxidase 1 / Glutathione peroxidase 1

GSTM: Glutathione S-transferase mu / Glutathione S-transferase mu

Hmox1: Heme oxigenase 1 / Heme oxygenase 1

HSD3B1: 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 / 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1

HSPA2: Proteína de choque térmico família A membro 2/ Heat shock protein family A member 2

IACUC: Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais / Institutional Animal Care and Use Committee

KGN cells: Células tumorais de granulosa humana / Human granulosa-like tumor cell line

Lamp1: Proteína associada à membrana lisossomal 1 / Lysosomal-associated membrane protein 1

LH: Hormônio luteinizante / Luteinizing hormone

Lhcgr: Receptor de hormônio luteinizante / Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor

MBP: Monobutilftalato / Monobutyl phthalate

MBzP: Monobenzilftalato / Monobenzyl phthalate

MDH2: Malato desidrogenase 2 / Malate dehydrogenase 2

MEHP: Mono(2-etilhexil) ftalato / Mono(2-ethylhexyl) phthalate

MEP: Monoetilftalato / Monoethyl phthalate

MiBP: Monoisobutilftalato / Monoisobutyl phthalate

MinP: Monoisononilftalato / Monoisononyl phthalate

MM: Mistura de metabólitos / Mixture of metabolites

MNPs: Micro/nanoplásticos / Micro- and nanoplastics

MPs: Microplásticos / Microplastics

MYL6: Cadeia leve da miosina 6 / Myosin light chain 6

NBF: Formalina tamponada neutra / Neutral buffered formalin

NDUFA9: Subunidade 9 do complexo NADH desidrogenase / NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9

NDUFV2: Flavoproteína 2 do complexo NADH desidrogenase / NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2

NPs: Nanoplásticos / Nanoplastics

Nrfe2l2 (Nrf2): Fator nuclear relacionado a 2 do tipo eritroide / Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

PBS: Solução salina tamponada com fosfato / Phosphate-buffered saline

PDIA3: Isomerase de disulfeto da proteína A membro 3 / Protein disulfide isomerase family A member 3

PET: Polietileno tereftalato / Polyethylene terephthalate

PE: Polietileno / Polyethylene

PND: Dia pós-natal / Post-Natal day

PP: Polipropileno / Polypropylene

PRDX: Peroxirredoxina / Peroxiredoxin

PS: Poliestireno / Polystyrene

PS-NPs: Nanoplásticos de poliestireno / Polystyrene nanoplastics

PU: Poliuretano / Polyurethane

PVC: Cloreto de polivinila / Polyvinyl chloride

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa / Quantitative polymerase chain reaction

Sod1: Superóxido dismutase 1 / Superoxide dismutase 1

SOD2: Superóxido dismutase 2 / Superoxide dismutase 2

STAR: Proteína reguladora aguda da esteroidogênese / Steroidogenic acute regulatory protein

TPM1: Tropomiosina 1 / Tropomyosin 1

TPM2: Tropomiosina 2 / Tropomyosin 2

TUBA1A: Tubulina alfa 1A / Tubulin alpha 1A

TUBA1B: Tubulina alfa 1B / Tubulin alpha 1B

TUBA4A: Tubulina alfa 4A / Tubulin alpha 4A

TUBB3: Tubulina beta 3 / Tubulin beta 3

TUBB5: Tubulina beta 5 / Tubulin beta 5

UQCRC2: Proteína central 2 do complexo citocromo bc1 / Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2

VIM: Vimentina / Vimentin

XPO1: Exportina 1 / Exportin 1

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO, CONTEXTUALIZAÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

- Figura 1.** Representação da poluição plástica no ambiente marinho e níveis de MNPs no ecossistema marinho, terras agrícolas e amostras fecal Criado em BioRender.com. 19
- Figura 2.** Características físico-químicas e suas influências em micropartículas, como os nanoplásticos. Essas características determinam sua interação com o ambiente e sistemas biológicos, incluindo tamanho, carga e propriedades de superfície, área superficial/porosidade, concentração e aglomeração, além da capacidade de adsorver ftalatos e outros poluentes orgânicos. Criado em Biorender.com 22
- Figura 3.** Representação esquemática dos principais agentes estressores associados às respostas adaptativas da prole frente a insultos ocorridos durante o desenvolvimento intrauterino. A representação remete ao conceito de programação fetal e DOHaD, enumerando diferentes agentes estressores e suas consequências em nível celular e sistêmico na prole. Imagem criada em BioRender.com..... 24
- Figura 4.** Estabelecimento da reserva folicular durante o desenvolvimento ovariano. Após a implantação, as células germinativas primordiais (CGPs) migram para a crista genital, onde proliferam, formam ninhos de oogônias e iniciam a meiose. A quebra dos ninhos por apoptose resulta na formação dos folículos primordiais. A linha do tempo inferior compara as janelas de desenvolvimento reprodutivo entre humanos e roedores. Imagem criada com Biorender.com, inspirada em Ho, Shuk-Mei et al. 2018. 28
- Figura 5.** Dinâmica da foliculogênese ovariana. A ativação do folículo primordial é um processo irreversível, regulado por fatores inibitórios e estimulatórios independentes de gonadotrofinas. As transições iniciais até o estágio pré-antral ocorrem predominantemente por sinalização intraovariana, enquanto o crescimento antral torna-se progressivamente dependente de FSH. A atresia um possível destino em todas as etapas do desenvolvimento folicular. Imagem criada com biorender.com. 30
- Figura 6.** Dinâmica da esteroidogênese ovariana no folículo antral. As células da teca atuam na produção de andrógenos, que se difundem para as células da granulosa, onde são convertidos em estrogênios. Imagem criada com biorender.com..... 31

Capítulo 1

- Figure 1. Confocal microscopy of antral follicles and cells in vitro exposure to FPS-NPs and MM.** Representative confocal images showing the localization of fluorescently labeled nanoplastics (green) and cellular morphology of antral follicles (A–D) and cells attached on the bottom of the culture plate (E). DAPI for nuclei (blue), b-tubulin for microtubules (red) and phalloidin for actin filaments (magenta). (A) Control follicle. (B) Follicle exposed to 100 µg/mL NP (NP100). (C) Co-exposure of follicle to 5 µg/mL NP and 0.01 µg/mL MM (NP5 + MM0.01). (D) Co-exposure of follicle to 100 µg/mL NP and 10 µM MM (NP100 + MM10). 45
- Figure 2. Effects of exposure to PS-NP, MM, PS-NPs + MM on antral follicle growth.** Antral follicle growth was measured every 24 h over the 96 h of culture. Data are presented as mean ± SEM from four

independent experiments, with 12-15 follicles per treatment group. (A) PS-NPs follicle growth. (B) MM follicle growth. (C) Co-exposure follicle growth. Comparisons were made using two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control.46

Figure 3. Effects of PS-NP, MM, PS-NPs + MM exposure on hormone levels. Representative graphs of hormone levels of Estradiol (A), Progesterone (B), Testosterone (C) on culture media after 96 hours, quantified by ELISA. Data are presented as mean \pm SEM from four independent experiments, with 12-15 follicles per treatment group per culture. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.47

Figure 4. Effects of the exposure to PS-NP, MM, PS-NPs + MM on apoptosis-related gene expression. Representative graphs of mRNA expression levels of Bax (A), Bcl2 (B), Bax/Bcl2 ratio (C), Casp3 (D) and Casp8 (E), quantified by RT-qPCR. Data are presented as mean \pm SEM from four independent experiments, with 12-15 follicles per treatment group per culture. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control.48

Figure 5. Effects of the exposure to PS-NP, MM, PS-NPs + MM on oxidative stress related gene expression. Representative graphs of mRNA expression levels of Cat (A), Sod1 (B), Nrf2 (C), Gpx1 (D) and Hmox1 (E), quantified by RT-qPCR. Data are presented as mean \pm SEM from four independent experiments, with 12-15 follicles per treatment group per culture. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control49

Figure 6. Effects of the exposure to PS-NP, MM, PS-NPs + MM on steroidogenesis related gene expression. graphs of mRNA expression levels of Star (A), Cyp11a1 (B), Cyp17a1 (C), Hsd3b1 (D) and Cyp19a1 (E), quantified by RT-qPCR. Data are presented as mean \pm SEM from four independent experiments, with 12-15 follicles per treatment group. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control.50

Figure 7. Effects of the exposure to PS-NP, MM, PS-NPs + MM on hormone receptors gene expression. Representative graphs of mRNA expression levels of Esr2 (A), Lhcgr (B), Ar (C), quantified by RT-qPCR. Data are presented as mean \pm SEM from four independent experiments, with 12-15 follicles per treatment group per culture. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control. ...51

Capítulo 2

Figure 1. Confocal microscopy of neonatal in vitro exposed to FPS-NPs. Representative confocal images showing the localization of fluorescently labeled nanoplastics (green) and cellular morphology of neonatal ovaries (A- B). Nuclei were stained with DAPI (blue), β -tubulin (red). (A) Control ovary. (B) ovary exposed to 100 μ g/mL FPS -NP.74

Figure 2. Effects of isolated and combined exposure to PS-NPs and MM on caspase-related apoptotic genes. Representative graphs of mRNA expression levels of Casp3 (A), Casp8 (B) quantified

by RT-qPCR. Data are presented as mean \pm SEM from independent cultures, with 3 ovaries per treatment group per experiment. Comparisons were made using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control.75

Figure 3. Effects of isolated and combined exposure to PS-NPs and MM on cell cycle and proliferation genes. Representative graphs of mRNA expression levels of Ccnd2 (A), Cdk6 (B), Cdkn1c (C), Ki67 (D) quantified by RT-qPCR. Data are presented as mean \pm SEM from independent cultures, with 3 ovaries per treatment group per culture. Comparisons were made using two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control.76

Figure 4. Effects of isolated and combined exposure to PS-NPs and MM on oxidative stress-related genes. Representative graphs of mRNA expression levels of Cat (A), Sod1 (B), Gpx1 (C), Hmox1 (D) quantified by RT-qPCR. Data are presented as mean \pm SEM from independent cultures, with 3 ovaries per treatment group per culture. Comparisons were made using two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control. ...77

Figure 5. Effects of isolated and combined exposure to PS-NPs and MM on ovarian development and differentiation-related genes. Representative graphs of mRNA expression levels of Esr2 (A), Amh (B), Foxl2 (C) quantified by RT-qPCR. Data are presented as mean \pm SEM from independent cultures, with 3 ovaries per treatment group per culture. Comparisons were made using two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control.78

Figure 6. Effects of isolated and combined exposure to PS-NPs and MM on inflammatory and lysosomal trafficking genes. Representative graphs of mRNA expression levels of Lamp1 (A), Ccl2 (B) quantified by RT-qPCR. Data are presented as mean \pm SEM from independent cultures, with 3 ovaries per treatment group per culture. Comparisons were made using two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. * $p < 0.05$ compared with control and $^{\wedge} 0.05 < p < 0.1$ compared with control. ...79

Capítulo 3

Figura 1 Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas, e a composição da mistura de ftalatos (MF). Imagem criada em BioRender.com.93

Figura 2. Gráficos representativos do (A) peso no DPN1, (B) peso no DPN22, (C) peso no DPN120, (D) peso do ovário relativo ao peso corpóreo – DPN22, (E) peso do ovário relativo ao peso corpóreo – DPN120. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido de teste posterior de Tukey e apresentados pela média \pm DPM. **** $p < 0,0001$96

Figura 3. Gráficos representativos do (A) ciclo estral das ratas do DPN100-110, (B) estabelecimento da abertura vaginal, (C) primeiro estro. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido de teste posterior de Tukey e apresentados pela média \pm EPM. * $p < 0,05 \times \text{CTR}$; $^{\wedge} p < 0.05 \text{ T1XT4}$97

Figura 4. Gráficos representativos dos níveis hormonais plasmáticos de (A) estradiol e (B) Progesterona - DPN120. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido de teste posterior de Tukey e apresentados pela média \pm EPM. * $p < 0,05 \times \text{CTR}$; *** $p < 0.001$ 98

Figura 5. Análise comparativa de proteínas diferencialmente expressas após exposição perinatal a ftalatos. **(A)** Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de proteínas diferencialmente expressas nos grupos DPN22 e DPN120 após exposição a ftalatos. Os números indicam proteínas exclusivas ou compartilhadas entre os grupos, considerando proteínas reguladas positiva (UP) ou negativamente (DOWN). **(B)** Heatmap representando o padrão de expressão das proteínas diferencialmente expressas nos grupos experimentais. As cores indicam o nível relativo de expressão, sendo upreguladas em vermelho e downreguladas em azul.99

Figura 6. Proteínas persistentemente alteradas em duas idades (DPN22 e DPN120) após exposição perinatal a ftalatos. **(A)** Proteínas persistentemente downreguladas em DPN22 e DPN120. **(B)** Proteínas persistentemente upreguladas em DPN22 e DPN120. As redes de interação proteína–proteína (confiança > 0,7) e as análises de enriquecimento funcional indicam os principais processos biológicos associados às proteínas persistentemente alteradas ao longo do desenvolvimento.100

Figura 7. Proteínas inversamente reguladas em DPN22 e DPN120 após exposição perinatal a ftalatos. **(A)** Proteínas downreguladas em DPN22 e upreguladas em DPN120. **(B)** Proteínas upreguladas em DPN22 e downreguladas em DPN120. As redes de interação proteína–proteína (confiança > 0,7) e a análise de enriquecimento funcional identificam os principais processos biológicos associados às proteínas diferencialmente reguladas entre os dois períodos do desenvolvimento.101

Figura 8. Análise comparativa de proteínas diferencialmente expressas após exposição perinatal a nanoplásticos. **(A)** Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de proteínas diferencialmente expressas nos grupos DPN22 e DPN120 após exposição a nanoplásticos. Os números indicam proteínas exclusivas ou compartilhadas entre os grupos, considerando proteínas reguladas positiva (UP) ou negativamente (DOWN). **(B)** Heatmap representando o padrão de expressão das proteínas diferencialmente expressas nos grupos experimentais. As cores indicam o nível relativo de expressão, sendo upreguladas em vermelho e downreguladas em azul.102

Figura 9. Proteínas persistentemente alteradas nas duas idades (DPN22 e DPN120) após exposição perinatal a nanoplásticos. **(A)** Proteínas persistentemente downreguladas em DPN22 e DPN120. **(B)** Proteínas persistentemente upreguladas em DPN22 e DPN120. A rede de interação proteína–proteína (confiança >0.7) e a análise de enriquecimento funcional indicam os principais processos biológicos associados às proteínas persistentemente alteradas ao longo do desenvolvimento.103

Figura 10. Proteínas inversamente reguladas em DPN22 e DPN120 após exposição perinatal a nanoplásticos. **(A)** Proteínas downreguladas em DPN22 e upreguladas em DPN120. **(B)** Proteínas upreguladas em DPN22 e downreguladas em DPN120. As redes de interação proteína–proteína (confiança > 0,7) e a análise de enriquecimento funcional identificam os principais processos biológicos associados às proteínas diferencialmente reguladas entre os dois períodos do desenvolvimento....104

Figura 11. Análise comparativa de proteínas diferencialmente expressas após a coexposição a ftalatos e nanoplásticos. **(A)** Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de proteínas diferencialmente expressas nos grupos DPN22 e DPN120 após exposição a ftalatos. Os números indicam proteínas exclusivas ou compartilhadas entre os grupos, considerando proteínas reguladas positiva (UP) ou negativamente (DOWN). **(B)** Heatmap representando o padrão de expressão das proteínas

diferencialmente expressas nos grupos experimentais. As cores indicam o nível relativo de expressão, sendo upreguladas em vermelho e downreguladas em azul.105

Figura 12. Proteínas persistentemente alteradas em duas idades (DPN22 e DPN120) após coexposição perinatal a ftalatos e nanoplásticos. **(A)** Proteínas persistentemente downreguladas em DPN22 e DPN120. **(B)** Proteínas persistentemente upreguladas em DPN22 e DPN120. As redes de interação proteína–proteína (confiança > 0,7) e as análises de enriquecimento funcional indicam os principais processos biológicos associados às proteínas persistentemente alteradas ao longo do desenvolvimento.106

Figura 13. Proteínas inversamente reguladas em DPN22 e DPN120 após coexposição perinatal a ftalatos e nanoplásticos. **(A)** Proteínas downreguladas em DPN22 e upreguladas em DPN120. **(B)** Proteínas upreguladas em DPN22 e downreguladas em DPN120. As redes de interação proteína–proteína (confiança > 0,7) e a análise de enriquecimento funcional identificam os principais processos biológicos associados às proteínas diferencialmente reguladas entre os dois períodos do desenvolvimento.107

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1. Primer sequences used for gene expression analysis42

Table 2. Physicochemical characteristics of nanoplastics in suspension44

Capítulo 2

Table 1. Primer sequences for qPCR analyses72

Table 2. Hydrodynamic diameter and zeta potential of nanoplastic suspensions and their co-exposures in water and culture medium at 0 h. The table presents the mean particle size (nm) and surface charge (zeta potential, mV) of polystyrene nanoplastics (PS-NPs) alone or in combination with the phthalate metabolite mixture (MM). Measurements were taken immediately after dispersion (0 h) at 37°C in the same culture conditions used for follicle exposure. FPS-NPs represent fluorescently labeled nanoplastics used for confocal imaging.....73

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO, CONTEXTUALIZAÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA	18
1.1. Os plásticos.....	18
1.2. Micro/nanoplásticos (MNPs)	18
1.3. Ftalatos e o conceito DOHaD	22
1.4. Ovário, Desenvolvimento e Janelas de Plásticidade	26
2. Objetivo Geral.....	32
2.1. Objetivos específicos	32
Capítulo I	34
Isolated and Combined Exposure to Polystyrene Nanoplastics and a Phthalate Metabolite Mixture Disrupt Antral Follicle Growth and Function of mice In Vitro	34
Abstract	35
1. Introduction	36
2. Material and Methods.....	38
2.1. Chemicals:	38
2.2. Polystyrene Nanoplastics Suspension and Characterization:	39
2.3. Animals:	39
2.4. Antral Follicle Culture	40
2.5. Internalization of Fluorescent Nanoparticles.....	40
2.6. Analysis of Antral Follicle Growth	41
2.7. Gene Expression Analysis	41
2.8. Hormone Measurements:	42
2.9. Statistical Analysis	43
3. Results	43
3.1. Particle Characterization and Internalization.....	43
3.2. Effects of PS-NPs, MM, and PS-NPs + MM on antral follicle growth	45
3.3. Effects of PS-NPs, MM, and PS-NPs + MM on Expression of Apoptosis-Related Genes	47
3.4. Effects of PS-NPs, MM, and PS-NPs + MM on Expression of Regulators of Oxidative Stress	48
3.5. Effects of PS-NPs, MM, and PS-NPs + MM on Expression of Regulators of Steroidogenesis	49
3.6. Effects of PS-NPs, MM, and PS-NPs + MM on Expression of Hormone Receptors.....	50
4. Discussion	51
5. Conclusion.....	56
6. References	57
Capítulo II	64
Co-exposure to Polystyrene Nanoplastics and Phthalate Metabolites Disrupts Cell Cycle and Oxidative Balance in mouse Neonatal Ovaries In Vitro	64
Abstract	65
1. Introduction	66
2. Methods.....	68
2.1. Chemical	68

2.2.	Polystyrene Nanoplastics.....	69
2.3.	Characterization and Internalization assay:	69
2.4.	Animals	70
2.5.	Neonatal Ovary Culture	70
2.6.	Gene expression analysis	71
2.7.	Statistical Analysis	72
3.	Results	72
3.1.	PS-NPs Characterization and Internalization.....	72
3.2.	Effects of Isolated and Combined Exposure to PS-NPs and MM on Caspase-Related Apoptotic Genes	74
3.3.	Effects of Isolated and Combined Exposure to PS-NPs and MM on Cell Cycle and Proliferation Genes	75
3.4.	Effects of Isolated and Combined Exposure to PS-NPs and MM on Oxidative Stress Genes	76
3.5.	Effects of Isolated and Combined Exposure to PS-NPs and MM on Ovarian Development and Differentiation-Related Genes	77
3.6.	Effects of Isolated and Combined Exposure to PS-NPs and MM on Inflammatory and Lysosomal Trafficking Genes	78
4.	Discussion	79
5.	References	83
	Capítulo III	89
	Exposição perinatal a nanoplasticos e ftalatos compromete a função ovariana a longo prazo por desregulação do proteoma mitocondrial e do citoesqueleto	89
1.	Introdução	90
2.	Materiais e Métodos:	91
2.1.	Justificativa da dose	93
2.2.	Sinais físicos externos do início da puberdade	93
2.3.	Análise da ciclicidade estral	94
2.4.	Avaliação hormonal plasmática.....	94
2.5.	Expressão proteica global por espectrometria de massa (LC – MS/MS)	94
2.6.	Enriquecimento funcional e análises	95
2.7.	Análise estatística	95
3.	Resultados	96
3.1.	Efeitos em dados biométricos	96
3.2.	Efeitos na ciclicidade estral e estabelecimento da puberdade.....	96
3.3.	Efeitos hormonais	97
3.4.	Efeitos da exposição a MF no perfil proteômico	98
3.5.	Efeitos da exposição a NPs no perfil proteômico	101
3.6.	Efeitos da coexposição a MF e NPs no perfil proteômico.....	104
4.	Discussão	107
5.	Referências	114
	Conclusão Geral	122
	REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO, CONTEXTUALIZAÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA ..	122

FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

1.1. Os plásticos

Os plásticos são materiais sintéticos, complexos e heterogêneos amplamente utilizados e descartados. Sua composição é baseada em uma estrutura de polímero à base de carbono e milhares de aditivos químicos para controlar propriedades como cor, flexibilidade, estabilidade, aversão a água, resistência ultravioleta e retardamento de chama (Landrigan et al., 2023). Os polímeros mais comumente utilizados são: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloreto de polivinila (PVC), tereftalato de polietileno (PET) e poliuretano (PU) (Singh Jadaun et al., 2022). Particularmente, o PS possui baixo custo e ótimas propriedades mecânicas, o que o torna muito utilizado e estudado por ser um dos mais comuns no cotidiano, sendo encontrado em materiais de construção, recipientes alimentares, espumas de embalagens e utensílios descartáveis (Jeong et al., 2022; Singh Jadaun et al., 2022).

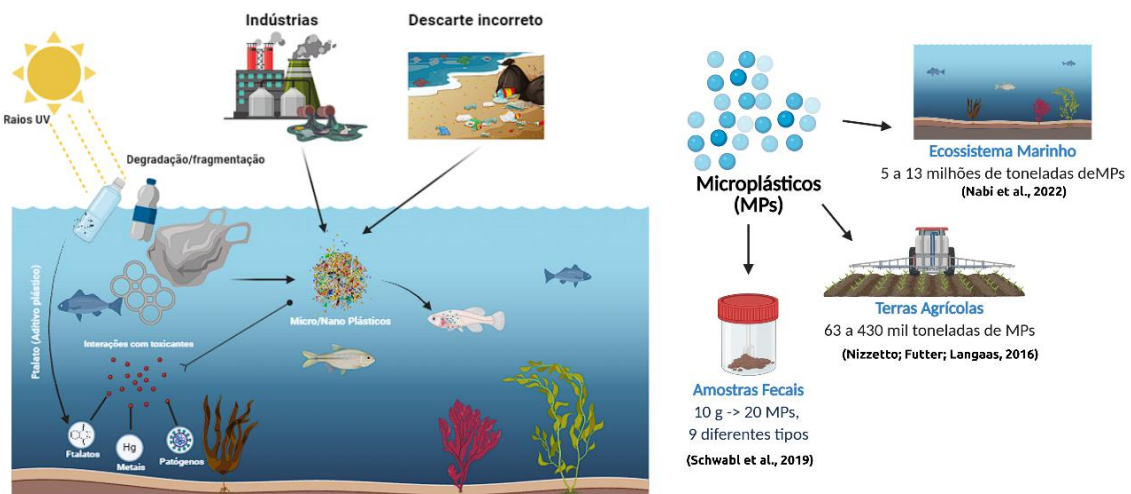
Do ponto de vista de produção, a manufatura desses polímeros cresce de forma exponencial ao longo dos anos. Em 2002, a produção foi de aproximadamente 204 milhões de toneladas, e em 2021, esse número atingiu a marca de 390,7 milhões de toneladas, com projeções de exceder 600 milhões de toneladas até 2030 (Talaie et al., 2025). Somado a isso, 90,2% da produção mundial de plásticos foi derivada de combustíveis fósseis, enquanto os plásticos recicláveis e bioplásticos representaram apenas 8,3% e 1,5% da produção mundial, respectivamente (Europe, 2022). Assim, esses dados demonstram que grande parte dessa produção é liberada no meio ambiente, onde é extremamente persistente, gerando um acúmulo exponencial de resíduos plásticos.

1.2. Micro/nanoplásticos (MNPs)

Uma vez no ambiente, os resíduos plásticos sofrem processos de degradação química, física e biológica gerando resíduos resistentes e nocivos para o ambiente e para a saúde humana (Wojnowska-Baryła; Bernat; Zaborowska, 2022). A degradação plástica não é um processo simples e totalmente eficaz devido à composição do polímero, produzindo enormes quantidades de partículas pequenas denominadas microplásticos (MPs, <5 mm) e nanoplásticos (NPs, ≤ 100 nm) (Gigault et al., 2018; Prata et al., 2020; Song et al., 2017).

32 Dependendo de sua origem, os MPs e os NPs são classificados como primários
33 ou secundários, e suas características físico-químicas são diretamente
34 correlacionadas com os efeitos em sistemas biológicos. Os primários são produzidos
35 em tamanhos pequenos com o objetivo de exercer funções comerciais específicas,
36 como por exemplo pastas de dentes e esfoliantes, enquanto os secundários são
37 resultado da decomposição de plásticos maiores devido a fenômenos físicos,
38 químicos ou biológicos (Li; Busquets; Campos, 2020; Prata et al., 2020b).

39 Nos últimos anos, a detecção de microplásticos no ambiente aumentou
40 significativamente, sobretudo devido à degradação da poluição plástica existente.
41 Diversos estudos analisaram os efeitos do aumento da poluição por
42 micro/nanoplásticos (MNPs) em todo o mundo e evidenciaram que aproximadamente
43 5 a 13 milhões de toneladas de detritos plásticos entram no ecossistema marinho a
44 cada ano (Nabi et al., 2022). Em 2015, as terras agrícolas da Europa continham entre
45 63 mil e 430 mil toneladas de MPs (Nizzetto; Futter; Langaas, 2016). Ainda, outro
46 estudo demonstrou que a cada 10 gramas de fezes humanas são encontrados 20
47 MPs, sendo eles de 9 tipos diferentes (Schwabl et al., 2019). A Figura 1 demonstra a
48 poluição plástica e sua degradação no ambiente marinho, além dos níveis de
49 microplásticos em diferentes amostras.



50

51 **Figura 1.** Representação da poluição plástica no ambiente marinho e níveis de MNPs no ecossistema
52 marinho, terras agrícolas e amostras fecais Criado em BioRender.com.

53 No ambiente, os MNPs representam uma ameaça crescente ao funcionamento
54 e à integridade de ecossistemas. Estudos recentes demonstraram que a ingestão de
55 MNPs pode ser detectada em quase todos os níveis zoológicos, principalmente por
56 serem facilmente ingeridos, devido ao seu tamanho reduzido em relação aos

57 macropolásticos (Nguyen et al., 2023; Wu et al., 2019). Embora os efeitos dessa
58 ingestão ainda não estejam completamente esclarecidos, já foram descritas
59 consequências como abrasão interna, obstrução do trato gastrointestinal, formação
60 de úlceras e até mortalidade em determinados organismos (Nguyen et al., 2023). Além
61 disso, organismos de níveis tróficos iniciais, como zooplâncton e invertebrados,
62 podem ingerir e acumular micropolásticos, alertando para a transferência e acumulação
63 trófica (Collignon et al., 2012).

64 Nos humanos, a exposição aos plásticos pode ocorrer por ingestão, inalação e
65 exposição dérmica (Dzierżyński et al., 2024; Prata et al., 2020c). A ingestão, principal
66 via de exposição, pode ocorrer por meio de alimentos e água contaminados. Entre os
67 alimentos, destacam-se aqueles armazenados em recipientes plásticos (exposição
68 estimada em 2.977 itens por pessoa), frutos do mar (estimada em $8,92 \times 10^4$ itens de
69 moluscos e de 518 a 4.600 itens de peixes por pessoa por ano) e sal (estimada em
70 506 itens por kg) (Wu et al., 2022). Outra via crítica de exposição é a inalação,
71 proveniente de tecidos sintéticos, abrasão de materiais e suspensão de micropolásticos
72 no ambiente. As concentrações estimadas variam de 1,1 a 59,4 fibras/m³ em
73 ambientes internos e de 0,3 a 1,5 fibras/m³ em ambientes externos (Zhang et al.,
74 2020). Por fim, o contato dérmico também constitui uma via conhecida de exposição.
75 Considerando que os poros da pele possuem diâmetro de 40 a 80 µm, a barreira
76 dérmica pode ser ultrapassada por NPs, fibras e aditivos. Embora poucos estudos
77 quantifiquem a exposição dérmica a essas substâncias, essa via está principalmente
78 relacionada à absorção de aditivos plásticos (Prata et al., 2020; Wu et al., 2022).

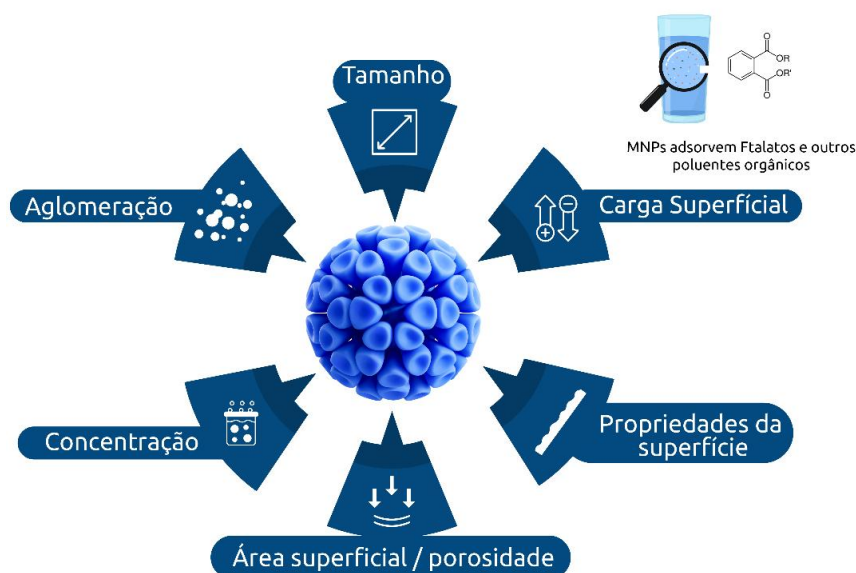
79 Estudos demonstraram que em humanos, os MNPs conseguem atingir o
80 coração (Yang et al., 2023), o fígado (Horvatits et al., 2022), a placenta (Ragusa et al.,
81 2021), o pulmão (Amato-Lourenço et al., 2021), os testículos (Zhao et al., 2023) e os
82 ovários (Montano et al., 2025). Além disso, partículas também foram encontradas
83 partículas em amostras biológicas de leite materno e urina (Liu et al., 2023; Pironti et
84 al., 2022). Estudos experimentais indicam que a exposição a essas partículas pode
85 induzir respostas inflamatórias, estresse oxidativo e danos celulares em diversos
86 modelos biológicos (An et al., 2021; Babaei et al., 2022; Wang et al., 2022; Zhu et al.,
87 2023).

88 Do ponto de vista físico-químico, a toxicidade de nanopartículas é influenciada
89 por forma, tamanho, carga, modificação de superfície, estrutura cristalina, capacidade

90 de adsorção, aglomeração e capacidade de dissolução em soluções. Essas
91 características determinam como essas partículas interagem com células e organelas,
92 resultando em maior ou menor internalização e toxicidade (Santacruz-Márquez;
93 González-De los Santos; Hernández-Ochoa, 2021). Assim, o estudo de partículas
94 plásticas torna-se um desafio, uma vez que são encontradas no ambiente com
95 diferentes características e tamanhos, demonstrando a importância de discutir, de
96 forma correlacionada, as características das partículas avaliadas e seus
97 consequentes efeitos toxicológicos em modelos experimentais.

98 Considerando esses determinantes físico-químicos da toxicidade, os NPs
99 tornam-se particularmente alarmantes dentro do grupo dos MNPs. Devido ao seu
100 tamanho ainda menor em comparação aos MPs, eles passaram a ser considerados
101 ubíquos no ambiente, especialmente em oceanos, atmosfera e solo, figurando entre
102 os principais contribuintes para a poluição plástica global (Lau et al., 2020; Rochman,
103 2018; Wu et al., 2019). Além disso, devido aos tamanhos nanométricos, os NPs
104 possuem maior facilidade em sua absorção pelo trato gastrointestinal e são capazes
105 de atravessar barreira biológicas importantes, como o cérebro, tornando-se mais
106 alarmantes para a saúde humana (Banerjee; Shelver, 2021; Campanale et al., 2020;
107 Ullah et al., 2023; Nihart et al., 2025).

108 Ademais, os NPs possuem uma grande área superficial hidrofóbica, o que os
109 torna ideal para adsorção e transporte de poluentes como os desreguladores
110 endócrinos (DEs) e outros poluentes químicos no ambiente (Deng et al., 2020).
111 Estudos tem mostrado que grande parte das partículas plásticas encontrados em
112 humanos possuíam quantidades de químicos ambientais como ftalatos e Bisfenol A
113 (Roslan et al., 2024). Dessa forma, os NPs tornam-se mais alarmantes do ponto de
114 vista de dispersão ambiental, da contaminação e dos efeitos tóxicos. Além disso,
115 deixam de ser preocupantes apenas de forma isolada, despertando atenção para sua
116 capacidade de interagir com poluentes químicos ambientais, favorecendo processos
117 de transporte, bioacumulação e potencialização de efeitos tóxicos. A Figura 2
118 demonstra as principais características físico-químicas que influenciam a toxicidade
119 de micropartículas, também demonstrando a capacidade dos MNPs de adsorver
120 outros poluentes químicos, como os ftalatos.



121

122 **Figura 2.** Características físico-químicas e suas influências em micropartículas, como os nanoplásticos.
 123 Essas características determinam sua interação com o ambiente e sistemas biológicos, incluindo
 124 tamanho, carga e propriedades de superfície, área superficial/porosidade, concentração e
 125 aglomeração, além da capacidade de adsorver ftalatos e outros poluentes orgânicos. Criado em
 126 Biorender.com

127 1.3. Ftalatos e o conceito DOHaD

128 O plástico possui em sua composição diversos aditivos químicos adicionados
 129 a fim de conferir certas características de acordo com o objetivo do polímero, como
 130 por exemplo resistência à chama, maleabilidade, cor e forma (Zhang et al., 2024). Um
 131 dos principais aditivos utilizados na manufatura do plástico são os ftalatos, compostos
 132 químicos derivados do ácido ftálico que são tipicamente aplicados para conferir maior
 133 maleabilidade, e são amplamente utilizados em telhados, pisos, tapetes, embalagens
 134 de alimentos e bebidas, peças de automóveis, bolsas de sangue, equipamentos de
 135 diálise e fabricação de luvas (Bošnjir et al., 2003; Schettler, 2006; Wang; Zhu; Kannan,
 136 2019).

137 A ligação não-covalente aos produtos com os quais eles são empregados
 138 permite sua liberação e, por consequência, a contaminação de água potável (0,16-
 139 170 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$), amostras de ar ($<0,4\text{-}65 \text{ ng}/\text{m}^3$) e amostras de poeira (2,38-4,1 g/kg)
 140 (Przybylińska; Wyszowski, 2016). Assim, considerando a produção exacerbada de
 141 produtos plásticos, a incorporação de ftalatos em produtos de uso comum e a
 142 presença comprovada no ambiente, dados de biomonitoração estima-se que 75 a

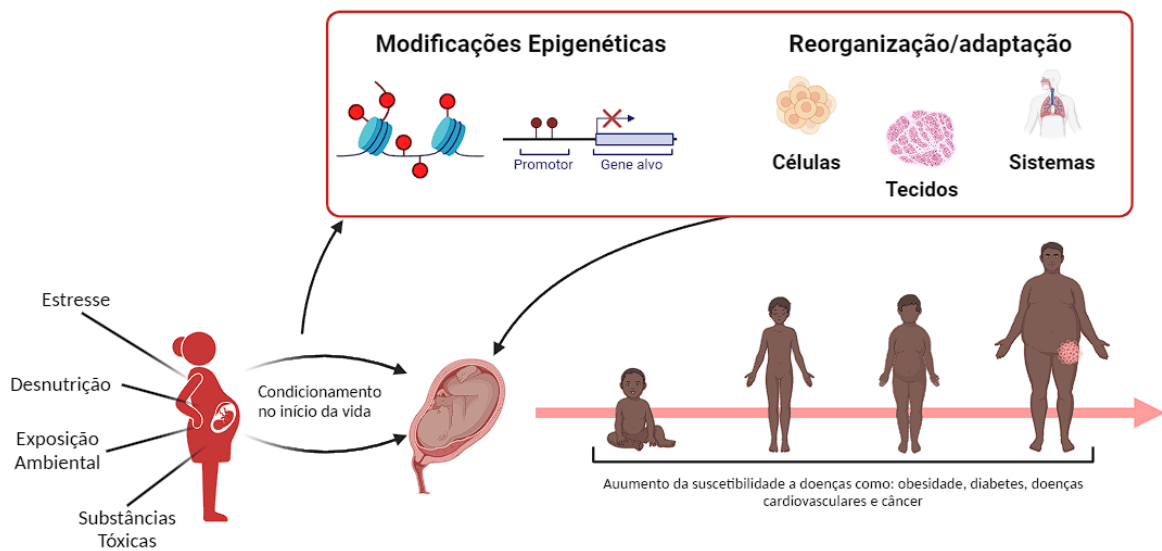
143 100% da população é exposta a ftalatos no dia a dia, através da via oral, inalação e
144 contato dérmico (Hannon; Flaws, 2015; Silva et al., 2004).

145 Os ftalatos são comumente conhecidos como diésteres do ácido ftálico, entre
146 os quais se destacam o di(2-etilhexil) ftalato (DEHP), o dibutilftalato (DBP) e o
147 dietilftalato (DEP) (Hannon; Flaws, 2015). Após a exposição, os ftalatos são
148 rapidamente metabolizados pelo organismo, sendo os diésteres clivados em
149 monoésteres, formas frequentemente responsáveis por grande parte da toxicidade
150 associada a esses compostos (Meeker; Sathyanarayana; Swan, 2009). Devido à sua
151 rápida metabolização e excreção, a dosagem dos metabólitos urinários é amplamente
152 utilizada como principal método de biomonitoramento da exposição a ftalatos (Wang;
153 Zhu; Kannan, 2019).

154 Essa problemática torna-se ainda mais complexa, visto que os ftalatos atuam
155 predominantemente como substâncias antiandrogênicas, e por isso, são enquadrados
156 no grupo de substâncias classificadas como DEs (Fisher, 2004). DEs são substâncias
157 que alteram a homeostase ou a ação hormonal endógena, alterando a produção,
158 liberação, transporte e metabolismo de hormônios (Braun, 2017). Dessa forma, os
159 DEs têm efeitos nocivos potenciais em sistemas hormônio-dependentes, como o
160 sistema reprodutivo, podendo causar uma série de adversidades como puberdade
161 precoce, níveis alterados de hormônios esteroides sexuais, ciclicidade menstrual
162 interrompida, endometriose (Chattopadhyay; Ghosh, 2021) e, até mesmo efeitos
163 sobre a prole (De Freitas et al., 2021; Venturelli et al., 2019).

164 O conceito das origens desenvolvimentistas da saúde e da doença/
165 *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) postula que fatores
166 ambientais no início da vida, como na gestação e amamentação, são capazes de
167 influenciar a programação epigenética e modificar microambientes teciduais,
168 alterando a saúde e a doença do indivíduo no futuro (Wadhwa et al., 2009).
169 Historicamente, em 1986, David Barker despertou o interesse da comunidade
170 científica acerca da preocupação sobre a exposição a fatores estressores no início da
171 vida e suas repercussões tardias (Barker; Osmond, 1986). Barker demonstrou uma
172 forte correlação entre a mortalidade por doença cardíaca isquêmica entre 1968 e 1978
173 e a mortalidade neonatal e infantil entre 1921 e 1925 no País de Gales, e propôs a
174 hipótese de que a má nutrição no início da vida teria relação com o aumento da
175 mortalidade por doença coronariana no futuro (Barker; Osmond, 1986; Suzuki, 2018).

176 Após isso, diversos estudos experimentais e epidemiológicos foram realizados no
 177 âmbito do conceito DOHaD contribuindo para o entendimento de que a exposição a
 178 condições estressoras durante o início da vida impactam não apenas no aumento da
 179 incidência de doenças crônicas não transmissíveis, mas também podem influenciar a
 180 oncogênese nos descendentes, especialmente em órgãos dependentes de
 181 hormônios, como a próstata e a mama (Aquino et al., 2023; Barker; Osmond, 1986;
 182 Keinan-Boker et al., 2009; Santos et al., 2019, 2022; Varuzza et al., 2019). A Figura 3
 183 demonstra as principais bases teóricas e biológicas da temática DOHaD.



184
 185 **Figura 3.** Representação esquemática dos principais agentes estressores associados às respostas
 186 adaptativas da prole frente a insultos ocorridos durante o desenvolvimento intrauterino. A
 187 representação remete ao conceito de programação fetal e DOHaD, enumerando diferentes agentes
 188 estressores e suas consequências em nível celular e sistêmico na prole. Imagem criada em
 189 BioRender.com.

190 Com a evolução do conhecimento sobre o conceito DOHaD, com enfoque na
 191 dieta e doenças crônicas não transmissíveis, atualmente, expande-se a utilização de
 192 modelos experimentais associando a exposição perinatal a químicos ambientais,
 193 como os DEs e MNPs (Romano et al., 2022). No sistema genital, especificamente o
 194 masculino, destacam-se dentre as principais alterações em modelos experimentais a
 195 interferência na distância anogenital, atraso na instalação da puberdade, anomalias
 196 nas células germinativas e na espermatogênese, toxicidade nos testículos e
 197 epidídimos associadas com a disgenesia testicular e alterações na próstata (Aquino
 198 et al., 2023; Latini; De Felice; Verrotti, 2004; Manikkam et al., 2013; Scarano et al.,
 199 2019, 2009). No sistema genital feminino, além de alterações em vias hormonais, há

200 redução da reserva ovariana e efeitos sobre a foliculogênese e esteroidogênese,
201 alteração do peso corpóreo, modificações no perfil de expressão gênica, aumento da
202 incidência de câncer de mama; repercussões multigeracionais, entre outros (Chiang;
203 Mahalingam; Flaws, 2017; Hannon et al., 2015b; Hannon; Flaws, 2015b; Jurewicz;
204 Hanke, 2011; Rattan et al., 2018).

205 Além dos DEs, estudos demonstraram que MNPs têm a capacidade de
206 atravessar diferentes barreiras biológicas, dependendo de seu tamanho, aumentando
207 o potencial de bioacumulação juntamente com aditivos químicos em tecidos com
208 barreiras altamente seletivas, como o cérebro, protegido pela barreira
209 hematoencefálica (Amato-Lourenço et al., 2024). Essa bioacumulação também já foi
210 relatada na interface materno-fetal em humanos, sendo encontrados na placenta
211 (Ragusa et al., 2021), no mecônio e no cordão umbilical (Zhu et al., 2024)
212 demonstrando a capacidade dessas partículas chegarem até o embrião/feto durante
213 o desenvolvimento intrauterino.

214 Embora ainda escassos, estudos experimentais já fornecem evidências de
215 acúmulo, de translocação para o embrião/feto e de efeitos adversos de MNPs durante
216 a gestação (Grindler et al., 2018; Ragusa et al., 2021). A presença de MNPs no tecido
217 placentário foi descrita pela primeira vez em 2020, em ratos tratados com MNPs de
218 poliestireno (Fournier et al., 2020), e vem ganhando cada vez mais destaque,
219 demonstrando efeitos tanto estruturais, como funcionais (Aghaei et al., 2022; Fournier
220 et al., 2020; Hu et al., 2021; Nie et al., 2021; Yang et al., 2022). Além dos efeitos
221 diretos na placenta, a exposição gestacional a MNPs demonstraram causar restrição
222 do crescimento fetal na última metade da gravidez em ratos, redução da proporção do
223 peso feto-placentário, diminuição do comprimento do cordão umbilical e baixo peso
224 ao nascer (Zurub et al., 2023).

225 No sistema genital masculino, a exposição gestacional e lactacional a NPs
226 afetou o peso testicular, alterou o epitélio seminífero e reduziu a contagem
227 espermática da prole (Huang et al., 2022). No sistema genital feminino, a exposição
228 precoce a MNPs foi capaz de atrasar a puberdade, desregular o ciclo estral e provocar
229 alterações na foliculogênese e na proporção folicular da prole (Cheng et al., 2025; Dou
230 et al., 2024). Mesmo com poucos trabalhos, a literatura demonstra que tanto o sistema
231 reprodutor masculino quanto o feminino são sensíveis à exposição precoce a NPs.

232 É relevante destacar que mulheres e crianças apresentam níveis mais elevados
233 de exposição a ftalatos. Em bebês, o contato frequente com superfícies empoeiradas

234 e a utilização de brinquedos plásticos podem aumentar a absorção desses compostos
235 (Meeker; Sathyanarayana; Swan, 2009). Nas mulheres, estudos mostram que os
236 níveis urinários de metabólitos de ftalatos são significativamente maiores do que nos
237 homens, provavelmente devido à presença desses compostos em produtos
238 cosméticos de uso diário, como perfumes, loções, esmaltes e sprays capilares
239 (Hannon; Flaws, 2015; Silva et al., 2004). Esses achados evidenciam a importância
240 de compreender os efeitos da exposição a ftalatos em grupos mais vulneráveis,
241 incluindo impactos na saúde feminina, na gestação e na transferência materno-fetal,
242 bem como nos primeiros dias de vida dos descendentes.

243 **1.4. Ovário, Desenvolvimento e Janelas de Plásticidade**

244 O ovário é a gônada feminina responsável por funções reprodutivas e
245 endócrinas. Trata-se de um órgão heterogêneo composto por um epitélio superficial,
246 um córtex contendo folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento,
247 corpos lúteos e estroma, e uma medula rica em vasos sanguíneos, vasos linfáticos e
248 fibras nervosas (Clement, 1987; Junqueira; Carneiro, 2012). Dentre as funções dos
249 ovários destacam-se a maturação e a oocitação do gameta feminino, bem como, a
250 produção e secreção de hormônios sexuais femininos, controlando muitos aspectos
251 do desenvolvimento e da fisiologia feminina (Hannon; Flaws, 2015).

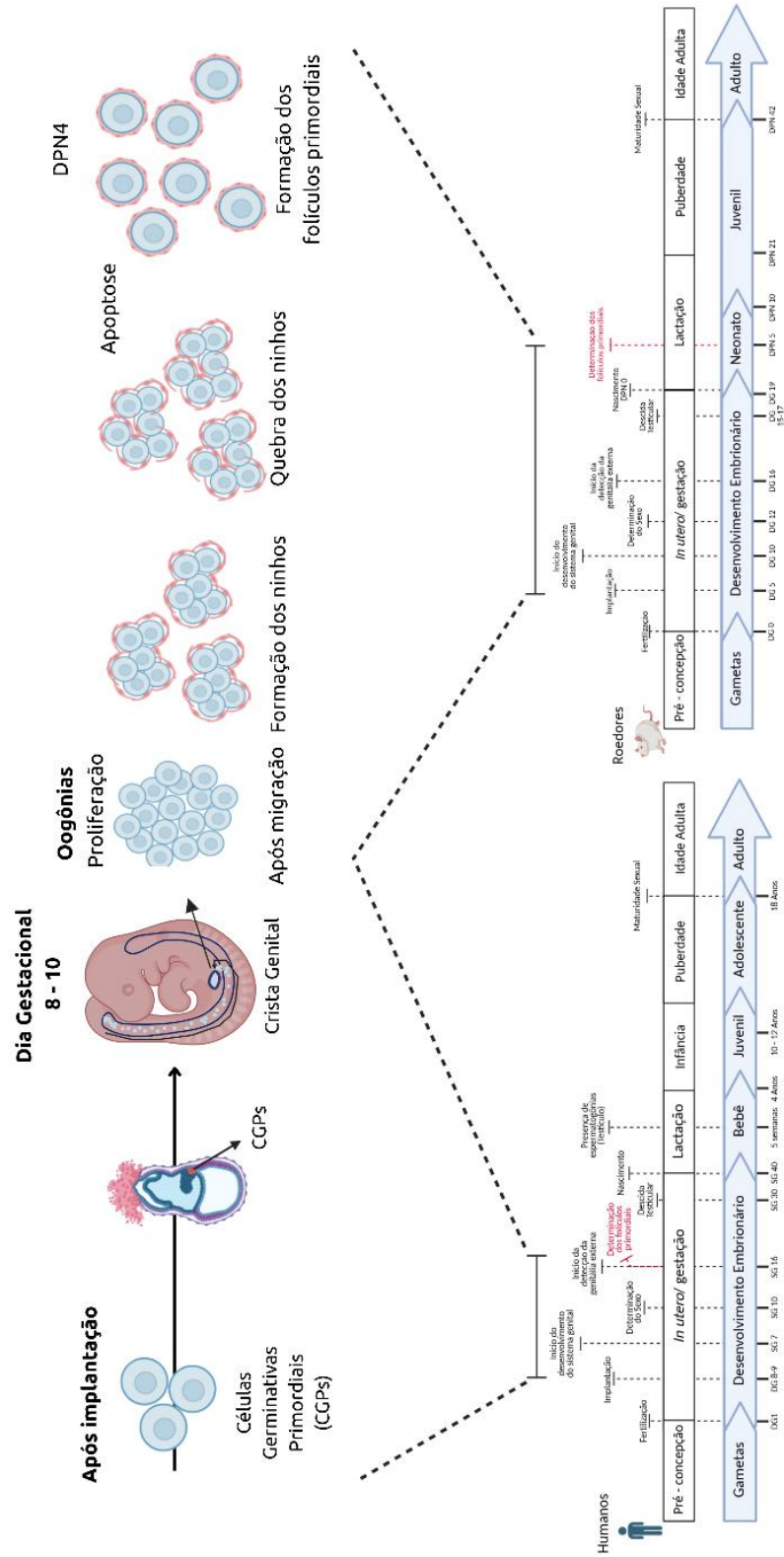
252 O componente funcional dos ovários, os folículos, são compostos por um oócito
253 circundado por dois tipos de células: células da granulosa e células da teca. Nos
254 ovários, os folículos sofrem um processo denominado foliculogênese que consiste no
255 desenvolvimento e maturação folicular, coordenado por fatores autócrinos,
256 parácrinos, justácrinos e uma rigorosa regulação endócrina por gonadotrofinas
257 hipofisárias (hormônio folículo estimulante – FSH e hormônio luteinizante – LH)
258 (Orisaka, et al., 2021; Edson et al., 2009). A quantidade de folículos nos mamíferos é
259 determinada no período perinatal (Hannon; Flaws, 2015; Pepling, 2006), definindo a
260 reserva folicular e, conseqüentemente, a expectativa de vida reprodutiva.

261 Durante o desenvolvimento embrionário, as células germinativas primordiais
262 migram do saco vitelino para a crista genital, através do mesentério posterior, e se
263 alojam na gônada em diferenciação. Em sequência, essas células proliferam
264 massivamente por mitose e se aglomeram em ninhos nas quais células escamosas
265 pré-granulosas circundam as oogônias. Ao estabelecer os ninhos, inicia-se a meiose
266 transformando as oogônias em oócitos primários até serem parados no estágio

267 diplóteno da prófase I da meiose até a puberdade (Baillet; Mandon-Pepin, 2012;
268 Borum, 1961; Hirshfield, 1991; Pepling, 2006). Nesse período, os ninhos começam a
269 se decompor para a formação de folículos primordiais.

270 A quebra desses aglomerados se dá pela morte de oócitos presentes por
271 apoptose, permitindo que as células somáticas envolvam oócitos sobreviventes,
272 formando os folículos primordiais. Essa morte de células germinativas precisa ser
273 altamente regulada para garantir a produção de uma população folicular suficiente
274 para sustentar a fertilidade feminina (Greenfeld et al., 2007). Em humanos o
275 estabelecimento dos folículos ocorre por volta do 6º - 9º mês de gestação, e em
276 roedores, por volta do 3º dia pós-natal, quando começa a formação dos folículos
277 primordiais (Hannon; Flaws, 2015). Nesse sentido, exposições durante esse período
278 de estabelecimento da reserva folicular podem ser determinante para a saúde
279 reprodutiva, considerando que fenômenos de morte celular, estresse oxidativo e
280 influência hormonal podem comprometer a relação entre sinalizações inibitórias e
281 proliferativas nos folículos primordiais dormentes, gerando ativação precoce de
282 folículos primordiais desencadeando senescência ovariana precoce (Gaytan et al.,
283 2015). A figura 4 elucidada o desenvolvimento ovariano, a formação dos folículos
284 primordiais e a linha do tempo desse desenvolvimento em humanos e roedores.

285



286
 287
 288
 289
 290
 291

Figura 4. Estabelecimento da reserva folicular durante o desenvolvimento ovariano. Após a implantação, as células germinativas primordiais (CGPs) migram para a crista genital, onde proliferam, formam ninhos de oogônias e iniciam a meiose. A quebra dos ninhos por apoptose resulta na formação dos folículos primordiais. A linha do tempo inferior compara as janelas de desenvolvimento reprodutivo entre humanos e roedores. Imagem criada com Biorender.com, inspirada em Ho, Shuk-Mei et al. 2018.

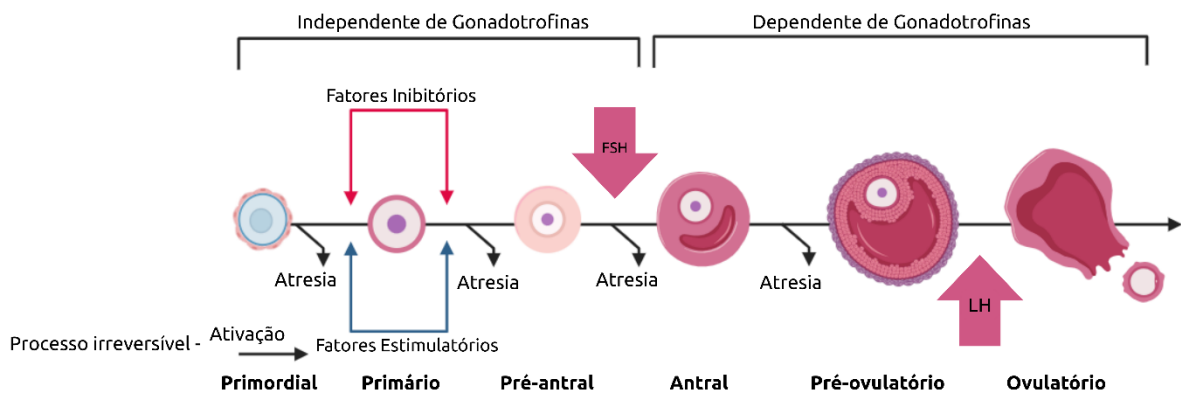
292 Após sua formação, os folículos primordiais permanecem dormentes por um
293 longo período e seu recrutamento e desenvolvimento podem ser classificados em três
294 principais fases. A primeira consiste na transição folicular entre os estágios
295 primordiais, primários e pré-antrais, fase independente de gonadotrofinas (FSH e LH)
296 e que normalmente acontece por sinalizações parácrinas e autócrinas por múltiplos
297 fatores de crescimento, processo rigorosamente regulado pela comunicação entre
298 oócito, células da granulosa e células somáticas circundantes (Hannon; Flaws., 2015).

299 Durante essa transição, ocorre uma mudança morfológica nas células da
300 granulosa, de escamosas para cúbicas, e o folículo passa a ser denominado folículo
301 primário. Em sequência, se desenvolvem em folículos pré-antrais, que são rodeados
302 por pelo menos duas camadas de células da granulosa e em volta delas uma camada
303 de células da teca (Edson et al., 2009). A quiescência da reserva de folículos
304 primordiais é mantida por fatores de supressão da ativação folicular, enquanto o
305 recrutamento é iniciado por fatores estimulantes do desenvolvimento (Hannon; Flaws.,
306 2015). Assim, um desbalanço nesse processo inibitório/estimulatório pode favorecer
307 o recrutamento da reserva folicular de forma descontrolada.

308 A segunda fase consiste na transição para o estágio antral, folículo que contém
309 o ovócito rodeado por várias camadas de células cubóides da granulosa, duas
310 camadas externas de células da teca e um espaço (antral) preenchido por líquido,
311 com presença de hormônios esteroides, proteínas, polissacarídeos e moléculas de
312 manutenção e sinalização (Edson et al., 2009; Orisaka, et al., 2021). Esse folículo é
313 capaz de oocitar e produzir as quantidades necessárias de estradiol e testosterona
314 para o corpo feminino (Fletcher et al., 2022; Mourikes; Flaws, 2021). Esse processo
315 possui majoritariamente regulação intraovariana mas começa a adquirir dependência
316 de FSH. Nesse momento, a dependência de FSH é crucial para determinar o destino
317 folicular, seja ele crescimento ou atresia (Orisaka, et al., 2021).

318 Os reguladores intraovarianos que atuam na aquisição de dependência do FSH
319 envolvem diversos fatores, como a sinalização oocitária, e destaca-se a formação da
320 camada de células da teca que não apenas fornece suprimento sanguíneo, como
321 também as sensibiliza às gonadotrofinas (Orisaka, et al., 2021). A partir desse
322 momento, as células da teca tornam-se capazes de produzir andrógenos que irão se
323 ligar aos receptores de andrógenos nas células da granulosa, induzindo a expressão
324 do receptor de FSH (FSHR), promovendo crescimento folicular, sobrevivência e
325 aquisição da dependência de FSH (Orisaka, et al., 2021).

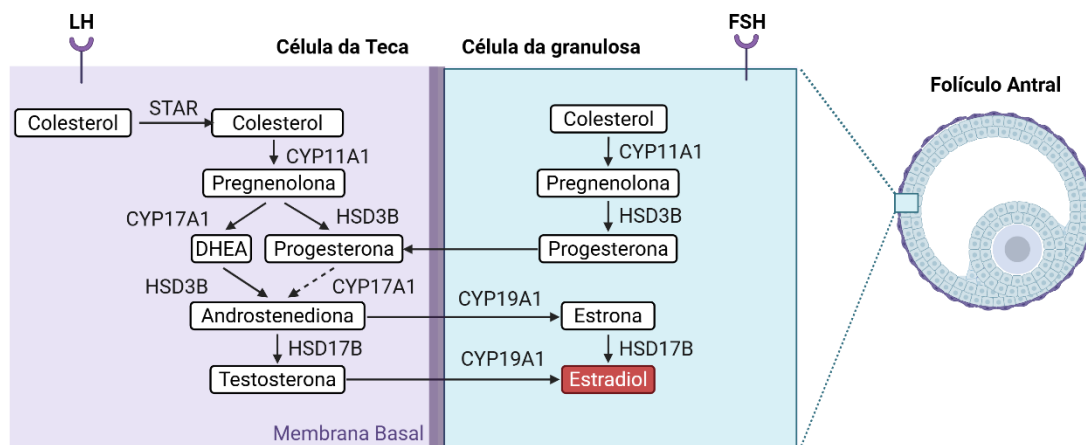
326 Por fim, a terceira fase consiste na fase dependente de gonadotrofina. Após um
 327 crescimento adequado, os folículos antrais são submetidos a controle cíclico pela
 328 ação do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Durante esse período, um pool de folículos
 329 antrais se desenvolve sendo necessária a seleção de um ou múltiplos folículos, a
 330 depender da espécie, para o processo final de maturação e consequente oocitação
 331 (Edson et al., 2009; Orisaka, et al., 2021). Após a oocitação, as células da granulosa
 332 e da teca do folículo remanescente diferenciam-se em células luteais grandes e
 333 pequenas, respectivamente, formando o corpo lúteo (Hannon; Flaws., 2015). A Figura
 334 5 demonstra esquematicamente a foliculogênese ovariana.



335 **Figura 5.** Dinâmica da foliculogênese ovariana. A ativação do folículo primordial é um processo
 336 irreversível, regulado por fatores inibitórios e estimulatórios independentes de gonadotrofinas. As
 337 transições iniciais até o estágio pré-antral ocorrem predominantemente por sinalização intraovariana,
 338 enquanto o crescimento antral torna-se progressivamente dependente de FSH. A atresia um possível
 339 destino em todas as etapas do desenvolvimento folicular. Imagem criada com biorender.com.

341 Outra função crucial do ovário é a produção de hormônios esteroides sexuais através
 342 da esteroidogênese ovariana, processo conduzido principalmente pelo folículo antral
 343 maduro e pelo corpo lúteo após a oocitação. Os hormônios reprodutivos produzidos
 344 podem atuar no próprio ovário, cérebro, hipófise, mama e útero, bem como podem
 345 atuar de maneira não reprodutiva no cérebro, sistema cardiovascular, tecido adiposo,
 346 pele, ossos e fígado (Brehm et al., 2020; Hannon; Flaws, 2015), demonstrando a
 347 importância da esteroidogênese ovariana para a saúde reprodutiva e em diversos
 348 tecidos não reprodutivos. Resumidamente, nas células da teca, o colesterol é
 349 transportado para a mitocôndria via proteína reguladora aguda da esteroidogênese
 350 (STAR) e convertido em pregnenolona pela CYP11A1. A pregnenolona é
 351 posteriormente transformada em progesterona (HSD3B) ou DHEA (CYP17A1), sendo
 352 convertida em androstenediona por ação da CYP17A1 e HSD3B, respectivamente. A

353 androstenediona pode originar a testosterona através da HSD17B. Esses andrógenos
 354 difundem-se para a granulosa, onde a androstenediona é convertida em estrona e a
 355 testosterona em estradiol, ambas por ação da CYP19A1 (Brehm et al., 2020; Hannon;
 356 Flaws, 2015). A Figura 6 representa a esteroidogênese ovariana demonstrando a
 357 interação das células da teca e da granulosa, essencial para a produção hormonal e
 358 manutenção da função ovariana.



359
 360 **Figura 6.** Dinâmica da esteroidogênese ovariana no folículo antral. As células da teca atuam na
 361 produção de andrógenos, que se difundem para as células da granulosa, onde são convertidos em
 362 estrogênios. Imagem criada com biorender.com.

363 Assim, o ovário possui diversas funções, extremamente coordenadas desde o
 364 desenvolvimento inicial até os processos de ação fisiológica. Nos últimos anos,
 365 disfunções reprodutivas como redução da fertilidade, cânceres hormônio-
 366 dependentes e infertilidade vêm crescendo no mundo. De acordo com um relatório da
 367 Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 17,5% da população mundial adulta
 368 sofre de infertilidade, sendo 1 em cada 6 pessoas no mundo (“Infertility prevalence
 369 estimates”, [s.d.]). Diversos fatores contribuem para a subfertilidade e infertilidade
 370 feminina, sendo a exposição a contaminantes ambientais uma das principais causas
 371 relacionadas com a toxicologia da reprodução em humanos e animais (Marques-Pinto;
 372 Carvalho, 2013; Woodruff et al., 2008). Ademais, a função ovariana normal é essencial
 373 para a saúde sistêmica feminina, desencadeando efeitos cardiovasculares, no humor,
 374 cérebro e no osso (Hannon; Flaws., 2015). Nesse sentido, é crucial compreender os
 375 efeitos de poluentes ambientais, como os resíduos plásticos, na função ovariana.

376 Os seres humanos também são expostos cronicamente aos ftalatos desde a
 377 gestação até a idade adulta (Hannon; Flaws., 2015). Portanto, estudos devem
 378 investigar os efeitos da exposição a poluentes ambientais, desde a fase intrauterina

379 até a idade adulta. Esses poluentes plásticos podem exercer toxicidade na função
380 ovariana em diferentes janelas de vulnerabilidade, desde efeitos diretos até efeitos na
381 reprogramação precoce. Por exemplo, a exposição a poluentes que comprometam o
382 estabelecimento da reserva folicular pode desencadear infertilidade permanente
383 devido ao esgotamento folicular precoce (Hirshfield, 1991; Pepling, 2006; Chen et al.,
384 2025). Ademais, outro mecanismo de toxicidade reprodutiva é atingir, de forma direta,
385 outros estágios foliculares, como o folículo antral, crucial para maturação final do
386 oócito, oocitação e produção hormonal (Hannon; Flaws., 2015). Esse último efeito
387 pode ser exercido através do comprometimento da função do crescimento e
388 maturação dos folículos antrais, bem como através da inibição da sua ação
389 esteroidogênica através da depleção de enzimas envolvidas nesse processo (Gholiof
390 et al., 2025; Meling et al., 2020).

391 Assim, o ovário apresenta múltiplas janelas de vulnerabilidade ao longo da vida,
392 incluindo o período perinatal de estabelecimento da reserva folicular, as fases iniciais
393 de ativação e crescimento folicular e o estágio antral dependente de esteroidogênese,
394 sendo todas altamente sensíveis a interferências ambientais (Pepling, 2006; Hannon
395 & Flaws, 2015; Mourikes & Flaws, 2021). Nesse sentido, são necessários novos
396 estudos que explorem os efeitos dos nanoplásticos, seus aditivos e seus efeitos
397 combinados na saúde reprodutiva feminina, explorando tanto o impacto direto em
398 folículos ovarianos quanto avaliando os efeitos desses poluentes no início da vida,
399 considerando as diferentes janelas de plasticidade do desenvolvimento ovariano e
400 folicular.

401 **2. OBJETIVO GERAL**

402 Avaliar os efeitos da exposição a uma mistura de ftalatos, a nanoplásticos de
403 poliestireno (PS-NPs), e da co-exposição de ambas as substâncias no ovário, em
404 diferentes momentos da biologia reprodutiva feminina, por meio de experimentos *in*
405 *vivo* e *in vitro*, considerando distintas janelas de suscetibilidade.

406 **2.1. Objetivos específicos**

- 407 • Avaliar os efeitos diretos da exposição a PS-NPs e a uma mistura de monoésteres
408 de ftalatos, de forma isolada ou combinada, sobre o crescimento, esteroidogênese
409 e foliculogênese de folículos antrais de camundongos *in vitro* – **Capítulo 1**

- 410 • Avaliar os efeitos diretos da exposição a PS-NPs e a uma mistura de monoésteres
411 de ftalatos, de forma isolada ou combinada, em ovários neonatais de camundongos
412 durante o estabelecimento da reserva ovariana *in vitro* – **Capítulo 2**
- 413 • Avaliar os efeitos da exposição gestacional e lactacional a PS-NPs e a uma mistura
414 de diésteres de ftalatos, de forma isolada ou combinada, sobre o estabelecimento
415 da maturidade reprodutiva e a saúde ovariana da prole de ratos– **Capítulo 3**

829 **CONCLUSÃO GERAL**

830 O presente trabalho investigou os efeitos da exposição a PS-NPs, a uma
831 mistura de diésteres ou monoésteres de ftalatos, bem como à co-exposição desses
832 contaminantes, na saúde reprodutiva feminina, integrando três modelos experimentais
833 complementares que abordam diferentes momentos da biologia reprodutiva feminina.
834 A dissertação demonstrou que a exposição a PS-NPs e ftalatos, isoladamente ou em
835 coexposição, compromete a função ovariana em diferentes janelas de
836 desenvolvimento. No modelo *in vitro* de folículos antrais, esses contaminantes foram
837 capazes de internalizar e interferir no crescimento e função do folículo antral. Em
838 ovários neonatais *in vitro*, a exposição precoce alterou genes essenciais à regulação
839 do ciclo celular, ao desenvolvimento folicular e ao balanço oxidativo, indicando que
840 insultos ambientais nesse período crítico podem comprometer a reserva ovariana,
841 principalmente na coexposição em doses ambientalmente relevantes. Por fim, a
842 exposição gestacional e lactacional promoveu alterações persistentes no
843 desenvolvimento reprodutivo da prole, nos níveis hormonais e no proteoma ovariano,
844 evidenciando disfunção mitocondrial, remodelação do citoesqueleto e desbalanço
845 energético.

846 A integração dos três capítulos demonstra que os efeitos observados na idade
847 adulta não são eventos isolados, mas resultado de alterações iniciadas em níveis
848 celulares e teciduais precoces, que podem se acumulam e se somam com os efeitos
849 da exposição na vida adulta, sugerindo disfunção ovariana persistente. Esses dados
850 se correlacionam com a exposição real, visto que somos expostos a contaminantes
851 ambientais, principalmente resíduos plásticos, durante toda a vida. Ademais, esses
852 achados reforçam o conceito DOHaD, mostrando que exposições ambientais durante
853 janelas críticas programam a função reprodutiva feminina a longo prazo. Do ponto de
854 vista translacional, os resultados destacam a importância de políticas públicas que
855 considerem exposições combinadas a plásticos e seus aditivos, visando proteger
856 gestantes, lactantes e recém-nascidos e prevenir efeitos adversos persistentes na
857 saúde reprodutiva.

858

859 **REFERÊNCIAS E FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA**

860 Aghaei, Z., Mercer, G. V., Schneider, C. M., Sled, J. G., Macgowan, C. K., Baschat, A. A.,
861 Kingdom, J. C., Helm, P. A., Simpson, A. J., Simpson, M. J., Jobst, K. J., & Cahill, L. S.

862 (2022). Maternal exposure to polystyrene microplastics alters placental metabolism in mice.
863 *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, 19(1), 1.
864 <https://doi.org/10.1007/s11306-022-01967-8>

865 Amato-Lourenço, L. F., Carvalho-Oliveira, R., Júnior, G. R., Dos Santos Galvão, L., Ando, R.
866 A., & Mauad, T. (2021). Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of*
867 *hazardous materials*, 416, 126124. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126124>

868 An, R., Wang, X., Yang, L., Zhang, J., Wang, N., Xu, F., Hou, Y., Zhang, H., & Zhang, L.
869 (2021). Polystyrene microplastics cause granulosa cells apoptosis and fibrosis in ovary
870 through oxidative stress in rats. *Toxicology*, 449, 152665.
871 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152665>

872 Aquino, A. M., Alonso-Costa, L. G., Santos, S. A. A., Rocha, V. A., Barbisan, L. F., Bedrat,
873 A., Justulin, L. A., Flaws, J. A., Lemos, B., & Scarano, W. R. (2023). Integrated transcriptome
874 and proteome analysis indicates potential biomarkers of prostate cancer in offspring of
875 pregnant rats exposed to a phthalate mixture during gestation and lactation. *Chemosphere*,
876 341, 140020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140020>

877 Babaei, A. A., Rafiee, M., Khodagholi, F., Ahmadpour, E., & Amereh, F. (2022).
878 Nanoplastics-induced oxidative stress, antioxidant defense, and physiological response in
879 exposed Wistar albino rats. *Environmental science and pollution research international*,
880 29(8), 11332–11344. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15920-0>

881 Baillet, A., & Mandon-Pepin, B. (2012). Mammalian ovary differentiation - a focus on female
882 meiosis. *Molecular and cellular endocrinology*, 356(1-2), 13–23.
883 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.029>

884 Banerjee, A., & Shelver, W. L. (2021). Micro- and Nanoplastic-Mediated Pathophysiological
885 Changes in Rodents, Rabbits, and Chickens: A Review. *Journal of food protection*, 84(9),
886 1480–1495. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-117>

887 Barker, D. J., & Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart
888 disease in England and Wales. *Lancet (London, England)*, 1(8489), 1077–1081.
889 [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)91340-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)91340-1)

890 BORUM K. (1961). Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Experimental*
891 *cell research*, 24, 495–507. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90449-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90449-9)

892 Bosnir, J., Puntarić, D., Skes, I., Klarić, M., Simić, S., & Zorić, I. (2003). Migration of
893 phthalates from plastic products to model solutions. *Collegium antropologicum*, 27 Suppl 1,
894 23–30.

895 Braun J. M. (2017). Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and
896 neurodevelopment. *Nature reviews. Endocrinology*, 13(3), 161–173.
897 <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.186>

898 Brehm, E., Zhou, C., Gao, L., & Flaws, J. A. (2020). Prenatal exposure to an environmentally
899 relevant phthalate mixture accelerates biomarkers of reproductive aging in a multiple and
900 transgenerational manner in female mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 98, 260–
901 268. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.10.009>

902 Campanale, C., Massarelli, C., Savino, I., Locaputo, V., & Uricchio, V. F. (2020). A Detailed
903 Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human
904 Health. *International journal of environmental research and public health*, 17(4), 1212.
905 <https://doi.org/10.3390/ijerph17041212>

906 CHATTOPADHYAY, Sandip; GHOSH, Angshita. Endocrine Disruptors Driven Female
907 Reproductive Ailments. *Proceedings of the Zoological Society*, v. 74, n. 4, p. 443–455, 1 dez.
908 2021.

909 Chen, J., Chen, L., Chen, Y., Jiao, Z., Zhang, H., Chen, C., Yuan, Y., Chen, Z., Lu, Y., & Du,
910 J. (2025). Exposure to diethyl phthalates impairs ovarian reserve and oocyte maturation in
911 female mice. *Ecotoxicology and environmental safety*, 303, 118956.
912 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.118956>

913 Cheng, X., Xue, Y., Wang, H., Ma, Z., Hu, N., Zhang, C., Gao, Y., Fan, R., Hu, L., Li, J.,
914 Zhang, D., Huang, J., Fang, S., Xiao, R., He, Y., Luo, T., & Zheng, L. (2025). Maternal
915 exposure to polystyrene nanoplastics during gestation and lactation caused fertility decline in
916 female mouse offspring. *Ecotoxicology and environmental safety*, 289, 117632.

917 Chiang, C., Mahalingam, S., & Flaws, J. A. (2017). Environmental Contaminants Affecting
918 Fertility and Somatic Health. *Seminars in reproductive medicine*, 35(3), 241–249.
919 <https://doi.org/10.1055/s-0037-1603569>

920 Clement P. B. (1987). Histology of the ovary. *The American journal of surgical pathology*,
921 11(4), 277–303. <https://doi.org/10.1097/00000478-198704000-00006>

922 Collignon, A., Hecq, J. H., Glagani, F., Voisin, P., Collard, F., & Goffart, A. (2012). Neustonic
923 microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Marine pollution*
924 *bulletin*, 64(4), 861–864. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.01.011>

925 de Freitas, T., Zapaterini, J. R., Moreira, C. M., de Aquino, A. M., Alonso-Costa, L. G.,
926 Bidinotto, L. T., Kass, L., Flaws, J. A., Scarano, W. R., & Barbisan, L. F. (2021). Prenatal
927 exposure to a mixture of different phthalates increases the risk of mammary carcinogenesis
928 in F1 female offspring. *Food and chemical toxicology : an international journal published for*

929 the British Industrial Biological Research Association, 156, 112519.
930 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112519>

931 Deng, Y., Yan, Z., Shen, R., Wang, M., Huang, Y., Ren, H., Zhang, Y., & Lemos, B. (2020).
932 Microplastics release phthalate esters and cause aggravated adverse effects in the mouse
933 gut. *Environment international*, 143, 105916. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105916>

934 Dou, Y., Zhang, M., Zhang, H., Zhang, C., Feng, L., Hu, J., Gao, Y., Yuan, X. Z., Zhao, Y.,
935 Zhao, H., & Chen, Z. J. (2024). Lactating exposure to microplastics at the dose of infants
936 ingested during artificial feeding induced reproductive toxicity in female mice and their
937 offspring. *The Science of the total environment*, 949, 174972.
938 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174972>

939 Dzierżyński, E., Gawlik, P. J., Puźniak, D., Flieger, W., Józwik, K., Teresiński, G., Forma, A.,
940 Wdowiak, P., Baj, J., & Flieger, J. (2024). Microplastics in the Human Body: Exposure,
941 Detection, and Risk of Carcinogenesis: A State-of-the-Art Review. *Cancers*, 16(21), 3703.
942 <https://doi.org/10.3390/cancers16213703>

943 EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to
944 revelation. *Endocrine Reviews*, v. 30, n. 6, p. 624–712, 2009. DOI: 10.1210/er.2009-0012.

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

946 Feng, Y., Yuan, H., Wang, W., Xu, Y., Zhang, J., Xu, H., & Fu, F. (2022). Co-exposure to
947 polystyrene microplastics and lead aggravated ovarian toxicity in female mice via the
948 PERK/eIF2 α signaling pathway. *Ecotoxicology and environmental safety*, 243, 113966.
949 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113966>

950 Fisher J. S. (2004). Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on
951 phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction (Cambridge, England)*, 127(3),
952 305–315. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00025>

953 Fletcher, E. J., Santacruz-Márquez, R., Mourikes, V. E., Neff, A. M., Laws, M. J., & Flaws, J.
954 A. (2022). Effects of Phthalate Mixtures on Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis.
955 *Toxics*, 10(5), 251. <https://doi.org/10.3390/toxics10050251>

956 Fournier, S. B., D'Errico, J. N., Adler, D. S., Kollontzi, S., Goedken, M. J., Fabris, L., Yurkow,
957 E. J., & Stapleton, P. A. (2020). Nanopolystyrene translocation and fetal deposition after
958 acute lung exposure during late-stage pregnancy. *Particle and fibre toxicology*, 17(1), 55.
959 <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00385-9>

960 Gaytan, F., Morales, C., Leon, S., Garcia-Galiano, D., Roa, J., & Tena-Sempere, M. (2015).
961 Crowding and Follicular Fate: Spatial Determinants of Follicular Reserve and Activation of

962 Follicular Growth in the Mammalian Ovary. *PLoS one*, 10(12), e0144099.
963 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144099>

964 Gigault, J., Halle, A. T., Baudrimont, M., Pascal, P. Y., Gauffre, F., Phi, T. L., El Hadri, H.,
965 Grassl, B., & Reynaud, S. (2018). Current opinion: What is a nanoplastic?. *Environmental*
966 *pollution (Barking, Essex : 1987)*, 235, 1030–1034.
967 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>

968 Gholiouf, M., Wessels, J. M., Foster, W. G., Turpin, V., & Leonardi, M. (2025). Effects of
969 polystyrene nanoplastics on the female reproductive system in mice: Implications for ovarian
970 function and follicular development. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 136, 108983.
971 <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2025.108983>

972 Greenfeld, C. R., Pepling, M. E., Babus, J. K., Furth, P. A., & Flaws, J. A. (2007). BAX
973 regulates follicular endowment in mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, 133(5), 865–
974 876. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0270>

975 Grindler, N. M., Vanderlinden, L., Karthikraj, R., Kannan, K., Teal, S., Polotsky, A. J., Powell,
976 T. L., Yang, I. V., & Jansson, T. (2018). Exposure to Phthalate, an Endocrine Disrupting
977 Chemical, Alters the First Trimester Placental Methylome and Transcriptome in Women.
978 *Scientific reports*, 8(1), 6086. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24505-w>

979 Haddadi, A., Kessabi, K., Boughammoura, S., Rhouma, M. B., Mlouka, R., Banni, M., &
980 Messaoudi, I. (2022). Exposure to microplastics leads to a defective ovarian function and
981 change in cytoskeleton protein expression in rat. *Environmental science and pollution*
982 *research international*, 29(23), 34594–34606. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18218-3>

983 Hannon, P. R., & Flaws, J. A. (2015). The effects of phthalates on the ovary. *Frontiers in*
984 *endocrinology*, 6, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00008>

985 Hannon, P. R., Brannick, K. E., Wang, W., & Flaws, J. A. (2015b). Mono(2-ethylhexyl)
986 phthalate accelerates early folliculogenesis and inhibits steroidogenesis in cultured mouse
987 whole ovaries and antral follicles. *Biology of reproduction*, 92(5), 120.
988 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.129148>

989 Hannon, P. R., Peretz, J., & Flaws, J. A. (2014). Daily exposure to Di(2-ethylhexyl) phthalate
990 alters estrous cyclicity and accelerates primordial follicle recruitment potentially via
991 dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in adult mice. *Biology of*
992 *reproduction*, 90(6), 136. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119032>

993 Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis
994 to revelation. *Endocrine reviews*, 30(6), 624–712. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>

995 Horvatits, T., Tamminga, M., Liu, B., Sebode, M., Carambia, A., Fischer, L., Püschel, K.,
996 Huber, S., & Fischer, E. K. (2022). Microplastics detected in cirrhotic liver tissue.
997 EBioMedicine, 82, 104147. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104147>

998 Ho, S. M., Cheong, A., Adgent, M. A., Veevers, J., Suen, A. A., Tam, N. N. C., Leung, Y. K.,
999 Jefferson, W. N., & Williams, C. J. (2017). Environmental factors, epigenetics, and
1000 developmental origin of reproductive disorders. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 68,
1001 85–104. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.07.011>

1002 Hu, J., Qin, X., Zhang, J., Zhu, Y., Zeng, W., Lin, Y., & Liu, X. (2021). Polystyrene
1003 microplastics disturb maternal-fetal immune balance and cause reproductive toxicity in
1004 pregnant mice. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 106, 42–50.
1005 <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.10.002>

1006 Huang, T., Zhang, W., Lin, T., Liu, S., Sun, Z., Liu, F., Yuan, Y., Xiang, X., Kuang, H., Yang,
1007 B., & Zhang, D. (2022). Maternal exposure to polystyrene nanoplastics during gestation and
1008 lactation induces hepatic and testicular toxicity in male mouse offspring. *Food and chemical*
1009 *toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research*
1010 *Association*, 160, 112803. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112803>

1011 Infertility prevalence estimates. [S.d.].

1012 Jeong, B., Baek, J. Y., Koo, J., Park, S., Ryu, Y. K., Kim, K. S., Zhang, S., Chung, C., Dogan,
1013 R., Choi, H. S., Um, D., Kim, T. K., Lee, W. S., Jeong, J., Shin, W. H., Lee, J. R., Kim, N. S.,
1014 & Lee, D. Y. (2022). Maternal exposure to polystyrene nanoplastics causes brain
1015 abnormalities in progeny. *Journal of hazardous materials*, 426, 127815.
1016 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127815>

1017 JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. *Histologia básica*. *Histologia Básica*, p.
1018 135–152, 2012.

1019 Jurewicz, J., & Hanke, W. (2011). Exposure to phthalates: reproductive outcome and
1020 children health. A review of epidemiological studies. *International journal of occupational*
1021 *medicine and environmental health*, 24(2), 115–141. [https://doi.org/10.2478/s13382-011-](https://doi.org/10.2478/s13382-011-0022-2)
1022 [0022-2](https://doi.org/10.2478/s13382-011-0022-2)

1023 Keinan-Boker, L., Vin-Raviv, N., Liphshitz, I., Linn, S., & Barchana, M. (2009). Cancer
1024 incidence in Israeli Jewish survivors of World War II. *Journal of the National Cancer Institute*,
1025 101(21), 1489–1500. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp327>

1026 Landrigan, P. J., Raps, H., Cropper, M., Bald, C., Brunner, M., Canonizado, E. M., Charles,
1027 D., Chiles, T. C., Donohue, M. J., Enck, J., Fenichel, P., Fleming, L. E., Ferrier-Pages, C.,
1028 Fordham, R., Gozt, A., Griffin, C., Hahn, M. E., Haryanto, B., Hixson, R., Iannelli, H., ...

- 1029 Dunlop, S. (2023). The Minderoo-Monaco Commission on Plastics and Human Health.
1030 *Annals of global health*, 89(1), 23. <https://doi.org/10.5334/aogh.4056>
- 1031 Latini, G., De Felice, C., & Verrotti, A. (2004). Plasticizers, infant nutrition and reproductive
1032 health. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 19(1), 27–33.
1033 <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.05.011>
- 1034 Lau, W. W. Y., Shiran, Y., Bailey, R. M., Cook, E., Stuchtey, M. R., Koskella, J., Velis, C. A.,
1035 Godfrey, L., Boucher, J., Murphy, M. B., Thompson, R. C., Jankowska, E., Castillo Castillo,
1036 A., Pilditch, T. D., Dixon, B., Koerselman, L., Kosior, E., Favoino, E., Gutberlet, J., Baulch,
1037 S., ... Palardy, J. E. (2020). Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. *Science (New*
1038 *York, N.Y.)*, 369(6510), 1455–1461. <https://doi.org/10.1126/science.aba9475>
- 1039 Li, C., Busquets, R., & Campos, L. C. (2020). Assessment of microplastics in freshwater
1040 systems: A review. *The Science of the total environment*, 707, 135578.
1041 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135578>
- 1042 Liu, S., Guo, J., Liu, X., Yang, R., Wang, H., Sun, Y., Chen, B., & Dong, R. (2023). Detection
1043 of various microplastics in placentas, meconium, infant feces, breastmilk and infant formula:
1044 A pilot prospective study. *The Science of the total environment*, 854, 158699.
1045 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158699>
- 1046 Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2013). Plastics derived
1047 endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance
1048 of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one*, 8(1), e55387.
1049 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055387>
- 1050 Marques-Pinto, A., & Carvalho, D. (2013). Human infertility: are endocrine disruptors to
1051 blame?. *Endocrine connections*, 2(3), R15–R29. <https://doi.org/10.1530/EC-13-0036>
- 1052 Meeker, J. D., Sathyanarayana, S., & Swan, S. H. (2009). Phthalates and other additives in
1053 plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philosophical transactions of the*
1054 *Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 2097–2113.
1055 <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0268>
- 1056 Meling, D. D., Warner, G. R., Szumski, J. R., Gao, L., Gonsioroski, A. V., Rattan, S., &
1057 Flaws, J. A. (2020). The effects of a phthalate metabolite mixture on antral follicle growth and
1058 sex steroid synthesis in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 388, 114875.
1059 <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114875>
- 1060 Montano, L., Raimondo, S., Piscopo, M., Ricciardi, M., Guglielmino, A., Chamayou, S.,
1061 Gentile, R., Gentile, M., Rapisarda, P., Oliveri Conti, G., Ferrante, M., & Motta, O. (2025).
1062 First evidence of microplastics in human ovarian follicular fluid: An emerging threat to female

1063 fertility. *Ecotoxicology and environmental safety*, 291, 117868.
1064 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.117868>

1065 Mourikes, V. E., & Flaws, J. A. (2021). REPRODUCTIVE TOXICOLOGY: Effects of chemical
1066 mixtures on the ovary. *Reproduction (Cambridge, England)*, 162(5), F91–F100.
1067 <https://doi.org/10.1530/REP-20-0587>

1068 NABI, Ghulam et al. The adverse health effects of increasing microplastic pollution on
1069 aquatic mammals. *Journal of King Saud University - Science*, v. 34, n. 4, p. 102006, 1 jun.
1070 2022.

1071 NGUYEN, Lan Huong et al. A concept for the biotechnological minimizing of emerging
1072 plastics, micro- and nano-plastics pollutants from the environment: A review. *Environmental*
1073 *Research*, v. 216, p. 114342, 1 jan. 2023.

1074 Nie, J. H., Shen, Y., Roshdy, M., Cheng, X., Wang, G., & Yang, X. (2021). Polystyrene
1075 nanoplastics exposure caused defective neural tube morphogenesis through caveolae-
1076 mediated endocytosis and faulty apoptosis. *Nanotoxicology*, 15(7), 885–904.
1077 <https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1930228>

1078 Nizzetto, L., Futter, M., & Langaas, S. (2016). Are Agricultural Soils Dumps for Microplastics
1079 of Urban Origin?. *Environmental science & technology*, 50(20), 10777–10779.
1080 <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04140>

1081 Orisaka, M., Miyazaki, Y., Shirafuji, A., Tamamura, C., Tsuyoshi, H., Tsang, B. K., &
1082 Yoshida, Y. (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle
1083 development: A mini-review. *Reproductive medicine and biology*, 20(2), 169–175.
1084 <https://doi.org/10.1002/rmb2.12371>

1085 Pepling M. E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female
1086 germ cell development. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 44(12), 622–632.
1087 <https://doi.org/10.1002/dvg.20258>

1088 Pironti, C., Notarstefano, V., Ricciardi, M., Motta, O., Giorgini, E., & Montano, L. (2022). First
1089 Evidence of Microplastics in Human Urine, a Preliminary Study of Intake in the Human Body.
1090 *Toxics*, 11(1), 40. <https://doi.org/10.3390/toxics11010040>

1091 Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2020).
1092 Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *The*
1093 *Science of the total environment*, 702, 134455.
1094 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134455>

1095 PRZYBYLIŃSKA, Paulina A.; WYSZKOWSKI, Mirosław. Environmental contamination with
 1096 phthalates and its impact on living organisms. *Ecological Chemistry and Engineering S*, v.
 1097 23, n. 2, p. 347–356, 1 jun. 2016.

1098 Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa,
 1099 F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., &
 1100 Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta.
 1101 *Environment international*, 146, 106274. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>

1102 Rattan, S., Brehm, E., Gao, L., Niermann, S., & Flaws, J. A. (2018). Prenatal exposure to
 1103 di(2-ethylhexyl) phthalate disrupts ovarian function in a transgenerational manner in female
 1104 mice. *Biology of reproduction*, 98(1), 130–145. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox154>

1105 Rochman C. M. (2018). Microplastics research-from sink to source. *Science (New York,*
 1106 *N.Y.)*, 360(6384), 28–29. <https://doi.org/10.1126/science.aar7734>

1107 Romano, M. A., Martino-Andrade, A. J., Mathias, P. C. F., Barella, L. F., & Romano, R. M.
 1108 (2022). Editorial: Endocrine Disruption in Light of Dohad: The Challenges of Contaminants of
 1109 Emerging Concern in Food and Water. *Frontiers in endocrinology*, 13, 898736.
 1110 <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.898736>

1111 Roslan, N. S., Lee, Y. Y., Ibrahim, Y. S., Tuan Anuar, S., Yusof, K. M. K. K., Lai, L. A., &
 1112 Brentnall, T. (2024). Detection of microplastics in human tissues and organs: A scoping
 1113 review. *Journal of global health*, 14, 04179. <https://doi.org/10.7189/jogh.14.04179>

1114 Santacruz-Márquez, R., González-De Los Santos, M., & Hernández-Ochoa, I. (2021).
 1115 Ovarian toxicity of nanoparticles. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 103, 79–95.
 1116 <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.06.002>

1117 Santos, S. A. A., Camargo, A. C., Constantino, F. B., Colombelli, K. T., Mani, F., Rinaldi, J.
 1118 C., Franco, S., Portela, L. M. F., Duran, B. O. S., Scarano, W. R., Hinton, B. T., Felisbino, S.
 1119 L., & Justulin, L. A. (2019). Maternal Low-Protein Diet Impairs Prostate Growth in Young Rat
 1120 Offspring and Induces Prostate Carcinogenesis With Aging. *The journals of gerontology.*
 1121 *Series A, Biological sciences and medical sciences*, 74(6), 751–759.
 1122 <https://doi.org/10.1093/gerona/gly118>

1123 Santos, S. A. A., Portela, L. M. F., Camargo, A. C. L., Constantino, F. B., Colombelli, K. T.,
 1124 Fioretto, M. N., Mattos, R., de Almeida Fantinatti, B. E., Denti, M. A., Piazza, S., Felisbino, S.
 1125 L., Zambrano, E., & Justulin, L. A. (2022). miR-18a-5p Is Involved in the Developmental
 1126 Origin of Prostate Cancer in Maternally Malnourished Offspring Rats: A DOHaD Approach.
 1127 *International journal of molecular sciences*, 23(23), 14855.
 1128 <https://doi.org/10.3390/ijms232314855>

1129 Scarano, W. R., Bedrat, A., Alonso-Costa, L. G., Aquino, A. M., Fantinatti, B. E. A., Justulin,
1130 L. A., Barbisan, L. F., Freire, P. P., Flaws, J. A., & Lemos, B. (2019). Exposure to an
1131 Environmentally Relevant Phthalate Mixture During Prostate Development Induces
1132 MicroRNA Upregulation and Transcriptome Modulation in Rats. *Toxicological sciences : an*
1133 *official journal of the Society of Toxicology*, 171(1), 84–97.
1134 <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz141>

1135 Scarano, W. R., Toledo, F. C., Guerra, M. T., de Campos, S. G., Júnior, L. A., Felisbino, S.
1136 L., Anselmo-Franci, J. A., Taboga, S. R., & Kempinas, W.deG. (2009). Long-term effects of
1137 developmental exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and
1138 inflammatory disorders and a possible role of androgens. *Toxicology*, 262(3), 215–223.
1139 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.011>

1140 Schettler T. (2006). Human exposure to phthalates via consumer products. *International*
1141 *journal of andrology*, 29(1), 134–185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00567.x>

1142 Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsics, T., Trauner, M., Reiberger, T., &
1143 Liebmann, B. (2019). Detection of Various Microplastics in Human Stool: A Prospective Case
1144 Series. *Annals of internal medicine*, 171(7), 453–457. <https://doi.org/10.7326/M19-0618>

1145 Silva, M. J., Barr, D. B., Reidy, J. A., Malek, N. A., Hodge, C. C., Caudill, S. P., Brock, J. W.,
1146 Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2004). Urinary levels of seven phthalate metabolites in the
1147 U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-
1148 2000. *Environmental health perspectives*, 112(3), 331–338. <https://doi.org/10.1289/ehp.6723>

1149 Singh Jadaun, J., Bansal, S., Sonthalia, A., Rai, A. K., & Singh, S. P. (2022). Biodegradation
1150 of plastics for sustainable environment. *Bioresource technology*, 347, 126697.
1151 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126697>

1152 Song, Y. K., Hong, S. H., Jang, M., Han, G. M., Jung, S. W., & Shim, W. J. (2017). Combined
1153 Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion on Microplastic Fragmentation by
1154 Polymer Type. *Environmental science & technology*, 51(8), 4368–4376.
1155 <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06155>

1156 Suzuki K. (2018). The developing world of DOHaD. *Journal of developmental origins of*
1157 *health and disease*, 9(3), 266–269. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000691>

1158 Talaie, A., Alaei, S., Hosseini, E., Rezaei, S., & Tamadon, A. (2025). Toxicological effects
1159 of micro/nano-plastics on human reproductive health: A review. *Toxicology letters*, 412, 1–
1160 20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2025.06.021>

1161 Ullah, S., Ahmad, S., Guo, X., Ullah, S., Ullah, S., Nabi, G., & Wanghe, K. (2023). A review
1162 of the endocrine disrupting effects of micro and nano plastic and their associated chemicals

1163 in mammals. *Frontiers in endocrinology*, 13, 1084236.
1164 <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1084236>

1165 Varuzza, M. B., Zapaterini, J. R., Colombelli, K. T., Barquilha, C. N., Justulin, L. A., Jr,
1166 Muñoz-de-Toro, M., Kass, L., & Barbisan, L. F. (2019). Impact of gestational low protein diet
1167 and postnatal bisphenol A exposure on chemically induced mammary carcinogenesis in
1168 female offspring rats. *Environmental toxicology*, 34(11), 1263–1272.
1169 <https://doi.org/10.1002/tox.22827>

1170 Venturelli, A. C., Meyer, K. B., Fischer, S. V., Kita, D. H., Philipsen, R. A., Morais, R. N., &
1171 Martino Andrade, A. J. (2019). Effects of in utero and lactational exposure to phthalates on
1172 reproductive development and glycemic homeostasis in rats. *Toxicology*, 421, 30–40.
1173 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.03.008>

1174 Wadhwa, P. D., Buss, C., Entringer, S., & Swanson, J. M. (2009). Developmental origins of
1175 health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic
1176 mechanisms. *Seminars in reproductive medicine*, 27(5), 358–368. [https://doi.org/10.1055/s-](https://doi.org/10.1055/s-0029-1237424)
1177 [0029-1237424](https://doi.org/10.1055/s-0029-1237424)

1178 Wang, W., Guan, J., Feng, Y., Nie, L., Xu, Y., Xu, H., & Fu, F. (2023). Polystyrene
1179 microplastics induced nephrotoxicity associated with oxidative stress, inflammation, and
1180 endoplasmic reticulum stress in juvenile rats. *Frontiers in nutrition*, 9, 1059660.
1181 <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1059660>

1182 Wojnowska-Baryła, I., Bernat, K., & Zaborowska, M. (2022). Plastic Waste Degradation in
1183 Landfill Conditions: The Problem with Microplastics, and Their Direct and Indirect
1184 Environmental Effects. *International journal of environmental research and public health*,
1185 19(20), 13223. <https://doi.org/10.3390/ijerph192013223>

1186 Woodruff, T. J., Carlson, A., Schwartz, J. M., & Giudice, L. C. (2008). Proceedings of the
1187 Summit on Environmental Challenges to Reproductive Health and Fertility: executive
1188 summary. *Fertility and sterility*, 89(2), 281–300.
1189 <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.002>

1190 Wu, P., Huang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Zhang, Y., He, F., Chen, H., Quan, G., Yan, J., Li, T.,
1191 & Gao, B. (2019). Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics.
1192 *Ecotoxicology and environmental safety*, 184, 109612.
1193 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109612>

1194 Wu, P., Lin, S., Cao, G., Wu, J., Jin, H., Wang, C., Wong, M. H., Yang, Z., & Cai, Z. (2022).
1195 Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity of microplastics in the human

1196 body and health implications. *Journal of hazardous materials*, 437, 129361.
1197 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129361>

1198 Yang, D., Zhu, J., Zhou, X., Pan, D., Nan, S., Yin, R., Lei, Q., Ma, N., Zhu, H., Chen, J., Han,
1199 L., Ding, M., & Ding, Y. (2022). Polystyrene micro- and nano-particle coexposure injures fetal
1200 thalamus by inducing ROS-mediated cell apoptosis. *Environment international*, 166, 107362.
1201 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107362>

1202 Yang, Y., Xie, E., Du, Z., Peng, Z., Han, Z., Li, L., Zhao, R., Qin, Y., Xue, M., Li, F., Hua, K.,
1203 & Yang, X. (2023). Detection of Various Microplastics in Patients Undergoing Cardiac
1204 Surgery. *Environmental science & technology*, 57(30), 10911–10918.
1205 <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c07179>

1206 Zeng, L., Zhou, C., Xu, W., Huang, Y., Wang, W., Ma, Z., Huang, J., Li, J., Hu, L., Xue, Y.,
1207 Luo, T., & Zheng, L. (2023). The ovarian-related effects of polystyrene nanoplastics on
1208 human ovarian granulosa cells and female mice. *Ecotoxicology and environmental safety*,
1209 257, 114941. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114941>

1210 Zhang, L., He, Y., Jiang, L., Shi, Y., Hao, L., Huang, L., Lyu, M., & Wang, S. (2024). Plastic
1211 additives as a new threat to the global environment: Research status, remediation strategies
1212 and perspectives. *Environmental research*, 263(Pt 1), 120007.
1213 <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.120007>

1214 Zhang, Q., Zhao, Y., Du, F., Cai, H., Wang, G., & Shi, H. (2020). Microplastic Fallout in
1215 Different Indoor Environments. *Environmental science & technology*, 54(11), 6530–6539.
1216 <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00087>

1217 Zhang, T., Li, L., Qin, X. S., Zhou, Y., Zhang, X. F., Wang, L. Q., De Felici, M., Chen, H., Qin,
1218 G. Q., & Shen, W. (2014). Di-(2-ethylhexyl) phthalate and bisphenol A exposure impairs
1219 mouse primordial follicle assembly in vitro. *Environmental and molecular mutagenesis*, 55(4),
1220 343–353. <https://doi.org/10.1002/em.21847>

1221 Zhao, Q., Zhu, L., Weng, J., Jin, Z., Cao, Y., Jiang, H., & Zhang, Z. (2023). Detection and
1222 characterization of microplastics in the human testis and semen. *The Science of the total*
1223 *environment*, 877, 162713. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162713>

1224 Zhu, M. R., Wang, H. R., Han, F. X., Cai, Z. L., Wang, J. J., & Guo, M. Y. (2023).
1225 Polyethylene microplastics cause apoptosis via the MiR-132/CAPN axis and inflammation in
1226 carp ovarian. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 265, 106780.
1227 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106780>

1228 Zhu, M., Li, X., Lin, W., Zeng, D., Yang, P., Ni, W., Chen, Z., Lin, B., Lai, L., Ouyang, Z., &
1229 Fan, J. (2024). Microplastic Particles Detected in Fetal Cord Blood, Placenta, and Meconium:

- 1230 A Pilot Study of Nine Mother-Infant Pairs in South China. *Toxics*, 12(12), 850.
1231 <https://doi.org/10.3390/toxics12120850>
- 1232 Zurub, R. E., Cariaco, Y., Wade, M. G., & Bainbridge, S. A. (2024). Microplastics exposure:
1233 implications for human fertility, pregnancy and child health. *Frontiers in endocrinology*, 14,
1234 1330396. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1330396>