

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

**IMPLICAÇÕES MATERNO-FETAIS DA EXPOSIÇÃO AOS
FTALATOS E NANOPLÁSTICOS DURANTE A GESTAÇÃO
DE RATAS**

NATÁLIA MAGOSSO

Orientador: Prof. Titular Wellerson Rodrigo Scarano

Co-Orientadora: Profa. Associada Arielle Cristina Arena

Botucatu – SP

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**IMPLICAÇÕES MATERNO-FETAIS DA EXPOSIÇÃO AOS
FTALATOS E NANOPLÁSTICOS DURANTE A GESTAÇÃO
DE RATAS**

NATÁLIA MAGOSSO

Orientador: Prof. Titular Wellerson Rodrigo Scarano

Co-Orientadora: Profa. Associada Arielle Cristina Arena

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

Wellerson Rodrigo Scarano

Botucatu – SP

2025

M211i	Magosso, Natália Implicações materno-fetais da exposição aos ftalatos e nanoplásticos durante a gestação de ratas / Natália Magosso. -- Botucatu, 2025 100 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Wellerson Rodrigo Scarano Coorientadora: Arielle Cristina Arena 1. Exposição materna. 2. Placenta. 3. Desenvolvimento fetal. 4. Desreguladores Endócrinos. 5. Poluentes ambientais. I. Título.
-------	--

Impacto potencial desta pesquisa:

Este trabalho contribui para a compreensão dos mecanismos pelos quais os ftalatos e nanoplásticos, poluentes onipresentes no meio ambiente e nos diversos ecossistemas, atuam no organismo de roedor, influenciando na saúde materna e no desenvolvimento fetal desses animais. Os resultados e a elucidação dos efeitos prejudiciais desses poluentes podem impactar na criação de novas regulamentações sobre o uso desses compostos e o descarte incorreto de lixo plástico, promovendo mudanças no comportamento da sociedade.

Potential impact of this research:

This work contributes to the understanding of the mechanisms by which phthalates and nanoplastics, ubiquitous pollutants in the environment and in various ecosystems, act on rodent organisms, influencing maternal health and fetal development. The results and the discovery of the harmful effects of these pollutants may impact the creation of new regulations on the use of these compounds and the incorrect disposal of plastic waste, promoting changes in society's behavior.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Implicações materno-fetais da exposição aos ftalatos e nanoplasticos durante a gestação de ratas

AUTORA: NATALIA MAGOSSO

ORIENTADOR: WELLERSON RODRIGO SCARANO

COORDINADORA: ARIELLE CRISTINA ARENA

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

Prof. Dr. WELLERSON RODRIGO SCARANO (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp

Profa. Dra. CRISTIANE FIGUEIREDO PINHO (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP - Câmpus de Bauru

Profa. Dra. ANA CAROLINA INHASZ KISS (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Botucatu, 26 de fevereiro de 2025



Documento assinado digitalmente
MARIA VICTORIA RAMALHO DA CUNHA
Data: 27/02/2025 11:05:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Maria Victória Ramalho da Cunha
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

“O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra”

Aristóteles

“Sozinhos, pouco podemos fazer; juntos, podemos fazer muito”

Helen Keller

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, **Valnice Boschezzi** e **Nilton Roberto Magosso**, e ao meu irmão, **Be Magosso**, por serem meu porto seguro e meu alicerce. Mãe, agradeço a você pela vida. Vocês são peças essenciais na minha jornada. Agradeço aos meus avós, **Walter Boschezzi** e **José Magosso**, que já estão com Deus, e a **Zilda Boschezzi** e **Izabel Magosso**, que estão entre nós, agradeço pelo amor que sempre me dedicaram e pela vida que deram aos meus pais.

Ao meu orientador, **Wellerson Rodrigo Scarano**, por me receber no laboratório desde 2019. Sou profundamente grata por ter tido a oportunidade de ser sua orientanda ao longo desses anos, e por poder continuar contando com seu apoio nesta jornada. Você é uma inspiração como pessoa, professor e orientador. Aprender e crescer sob sua orientação é uma experiência valiosa. Obrigada por acreditar em mim e no meu trabalho.

À **Ariana Musa de Aquino**, pelos ensinamentos e orientação durante a iniciação científica que me conduziram até aqui. Foi você quem me acolheu e me ensinou os primeiros passos, não apenas as técnicas e metodologias, mas também a despertar o gosto e o amor pela ciência. Sou grata por ter aprendido tanto com você.

Aos laboratórios **LabDECA** e **DMBOL**, pela parceria, companhia e convivência ao longo desses anos. Em especial aos meus colegas de trabalho, que viraram amigos para a vida toda. **Patrick**, obrigada por ser o cara mais engraçado do laboratório, me ajudar sempre que peço chorando e ser minha dupla todos esses anos, sei que posso contar com você para tudo. Admiro sua capacidade de analisar problemas, encontrar soluções criativas e aprender com cada experiência. **Vanessa**, agradeço por toda ajuda que tive no TCC, e que ainda tenho sempre que preciso. Admiro como você lida com situações difíceis e que exigem calma no laboratório, com você não tem dia ruim, adoro beber e rir junto. **Mirella**, você foi um presente de 2024 no LabDECA, sempre com seu “jeitinho” meigo e sincero, conquistando a todos. Você é luz que ilumina nossos dias e nos faz rir com suas frases inéditas. Admiro sua resiliência e sua força de vontade. Obrigada por estar comigo sempre. Aos alunos do DMBOL, em especial ao **Matheus** e à **Luisa** que são minha companhia diária e me fazem crescer profissionalmente. Matheus, ou melhor, Sofia, você é um workaholic que ama nos ensinar e nos oferecer seu melhor como professor e amigo, obrigada por me ajudar a escrever e a pensar fora da caixinha. Luisa, minha “gym bro” e dupla de placenta, como eu amo nossas tardes juntas, fofocando e treinando. Obrigada pela amizade que construímos esses anos.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica que pude acompanhar sua trajetória e que me ensinaram muito, **Victória**, nossa IC mais experiente e meiga, está sempre de prontidão para rodar um PCR ou realizar tarefas no biotério. Obrigada por sempre me apoiar e me fazer acreditar que posso mais. **Felipe**, passou apenas um ano conosco, mas sua ajuda no biotério e nas coletas dos animais foi indispensável. Como meu primeiro aluno de iniciação científica, você foi parte fundamental da minha trajetória. **Gabriel**, você é de grande valia para nosso laboratório, como aluno e amigo, sua proatividade, aliada à sua postura prestativa e colaborativa tornam o ambiente mais organizado. **Isabella Fávaro**, minha nova e querida IC, obrigada por me escolher e fazer parte do meu projeto, você é demais. Agradeço, por fim, a todos os outros alunos do LabDECA, **Vinícius**, **Isabela**, **Marina** e **Pedro**, sem vocês nosso grupo não estaria completo.

Ao meu namorado, **Lauro**, por me apoiar e me dar amor nos momentos difíceis, e me incentivar a continuar e não desistir. Agradeço aos meus amigos da graduação que fizeram parte dessa história. Vocês foram muito mais do que colegas de curso, foram minha família. Vocês transformaram os desafios da graduação em algo que valia a pena enfrentar. Nossos roles com esgurmo e as jantinhas na casa da Dreher se tornaram inesquecíveis na minha memória. Obrigada “Vidinhas”, **Natália**, Beatriz (**Dreher**), **Debby**, Poliana (**Pinda**), **Gabryel**, **Raphael** e **Luan**.

A todos os funcionários da UNESP, da Seção Técnica de Pós-Graduação e do STAEPE, que contribuíram de forma direta ou indireta para a minha trajetória. Meu muito obrigada a **Keila Emílio**, **Ricardo Teixeira** e **José Eduardo**, técnicos do departamento que, com paciência e dedicação, sempre estiveram dispostos a ajudar, e me salvar muitas vezes. Um agradecimento especial às funcionárias da limpeza, **Paula** e **Patrícia**, cujo trabalho muitas vezes passa despercebido, mas é absolutamente essencial.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq**, pelo apoio financeiro para desenvolver este projeto, concedido na forma de Bolsa de Mestrado (processo nº 88887.824314/2023-00). O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)**.

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

Agradeço, de forma geral, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho e que moldaram minha jornada, tornando-a não apenas possível, mas também significativa.

RESUMO

A placenta é um órgão materno-fetal essencial para o desenvolvimento adequado do feto, formando a interface entre a circulação da mãe e do feto. Continuamente, os seres humanos são expostos a desreguladores endócrinos (DEs), sendo que, na população de gestantes, estes podem interferir no desenvolvimento da prole. Os ftalatos, classificados DEs, são utilizados como plastificantes para garantir maior maleabilidade e flexibilidade aos plásticos. Quando o plástico é descartado no meio ambiente, ele se degrada em microplásticos (MPs) e nanoplásticos (NPs). É alarmante a quantidade de lixo plástico que vem se acumulando nos ecossistemas terrestre e aquático, o que tem se tornado um dos maiores desafios de saúde pública no mundo. A hipótese deste trabalho foi que condições adversas durante a gestação, como a exposição aos ftalatos e micro-nanoplásticos (MNPs), poderiam comprometer a saúde materna e alterar os processos celulares e bioquímicos desempenhados pela placenta trazendo consequências ao desenvolvimento da prole. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar se a exposição gestacional a uma mistura de ftalatos e MNPs interfere na interface materno-fetal, ao alterar a eficiência reprodutiva feminina, a morfologia placentária, o microbioma materno e fetal, e alterar o desenvolvimento fetal. Para isso, ratas prenhes da linhagem Sprague Dawley foram distribuídas em 6 grupos: CTR: (controle; veículo); T1: 20µg/kg/dia da mistura de ftalatos (MF); T2: 200mg/kg/dia MF; T3: 1mg/kg/dia de nanoplásticos 100 nm (NPs); T4: 20µg/kg/dia MF + 1mg/kg/dia NPs 100 nm; T5: 200mg/kg/dia MF + 1mg/kg/dia NPs 100 nm. O tratamento foi feito via oral do dia gestacional 5 (DG5) ao DG20. No DG20, 6-8 ratas de cada grupo foram anestesiadas e submetidas a laparotomia. Os fetos foram isolados, pesados e fixados para as análises viscerais e esqueléticas. Foram coletados os ovários e o útero para o registro de corpos lúteos, e sítios de implantação e reabsorções. As placentas seguiram para análises histológicas (HE), e moleculares (RTq-PCR e Western Blotting) para avaliação da expressão gênica e proteica de alvos relacionados com estresse oxidativo, sinalização celular, fatores de crescimento. Por fim, foram coletadas amostras fecais das mães no DG20 e de ratos pós-desmame no dia pós-natal (DPN) 22, para análise do microbioma intestinal. Os resultados indicaram aumento da perda pré-implantacional nos grupos T3, T4 e T5; redução do peso placentário e aumento de sua eficiência na prole masculina no grupo T3. Também foi observada uma diminuição na distância anogenital na prole feminina (T1) e masculina (T2), e uma redução no número de fetos com peso adequado para a idade de prenhez no T3. Além disso, houve aumento nos níveis de expressão gênica de alvos relacionados à diferenciação de células trofoblásticas e fatores de crescimento relacionados à angiogênese na placenta, principalmente nos grupos T3, T4 e T5. Em relação ao microbioma materno, houve redução da diversidade alfa no grupo T1, e aumento da classe *Bacilli* e das ordens *Bacillales* e *Lactobacillales*, nos grupos T2, T3 e T4. Dessa forma, os resultados encontrados demonstram que os NPs, isolados ou em combinação com os ftalatos, induziram alterações materno-placentários.

Palavras-chave: exposição materna, placenta, desenvolvimento fetal, desreguladores endócrinos, poluentes ambientais.

ABSTRACT

The placenta is a vital maternal-fetal organ for the healthy development of the fetus, forming an interface between maternal and fetal circulation. Human beings are continually exposed to endocrine disruptors (EDs), and in the pregnant population, these can interfere with the development of the profile. Phthalates, considered as EDs, are added to plastics as plasticizers to increase their malleability and flexibility. When these enter the environment, they degrade and form microplastics (MPs) and nanoplastics (NPs). One of the largest threats to human health is the rising global overuse of plastics. Unfavorable circumstances, like exposure to phthalates and micro-nanoplastics (MNPs), during early development, may have an impact on the profile's adult life. Therefore, the objective of this work was to investigate whether gestational exposure to a mixture of phthalates and NPs interferes with the maternal-fetal interface, altering female reproductive efficiency, placental morphology, maternal and fetal microbiome, and altering fetal development. For this, pregnant rats of the Sprague Dawley line were distributed into 6 groups: C: (control; vehicle); T1: 20µg/kg/day of the phthalate mixture (MF); T2: 200mg/kg/day MF; T3: 1mg/kg/day of 100 nm nanoplastics (NPs); T4: 20µg/kg/day MF + 1mg/kg/day NPs 100 nm; T5: 200mg/kg/day MF + 1mg/kg/day NPs 100 nm. Treatment was administered orally from gestational day 5 (GD5) to GD20. On GD20, 6-8 rats from each group were anesthetized and underwent laparotomy, and blood was collected for hormonal analysis. Fetuses were isolated and weighed for visceral and skeletal analyses. The ovaries and uterus were collected to record corpora lutea, and implantation and resorption sites. The placentas were sent for histological (HE) and molecular (RTq-PCR and Western Blotting) analysis to evaluate the gene expression of targets related to oxidative stress, cell signaling, and growth factors. Finally, fecal samples were collected from mothers on GD20 and from post-weaning rats on postnatal day (PND) 22 for analysis of the intestinal microbioma. The results indicated an increase in pre-implantation loss in T3, T4 and T5 groups, a reduction in placental weight and an increase in its efficiency in male offspring in T3 group. In addition, a decrease in anogenital distance was observed in female (T1) and male (T2); a reduction in the number of fetuses appropriate for the gestational age in T3 group. Furthermore, the treatment demonstrated an increase in gene expression levels of targets related to trophoblast cell differentiation and growth factors related to angiogenesis in the placenta, mainly in T3, T4 and T5 groups. In relation to the maternal microbiome, there was a reduction in alpha diversity (T1) and an increase in the *Bacilli* class and the *Bacillales* and *Lactobacillales* orders, in T2, T3 and T4 groups. Thus, the results found demonstrate that NPs, alone and in combination with the phthalate mixture, induced maternal and placental alterations.

Keywords: maternal exposure, placenta, fetal development, endocrine disruptors, environmental pollutants.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AGCC: ácidos graxos de cadeia curta

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

AIP: adequado para idade de prenhez

BBzP: butil benzil ftalato

BPA: bisfenol A

CAT: catalase

CEP: cone ectoplacentário

CEUA: Comissão de Experimentação Animal

CG: células de glicogênio

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CRH: hormônio liberador de corticotrofina

CTB: citotrofoblasto

CTG: células trofoblásticas gigantes

CTR: grupo controle

CYP11B1: citocromo P450, família 11, subfamília B, polipeptídeo 2

DAG: distância anogenital

DBP: di-n-butil ftalato

DE: desreguladores endócrinos

Dec: decídua basal

DEHP: di-2-etilhexil ftalato

DEP: dietil ftalato

DG: dia gestacional

DII: doença inflamatória intestinal

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DMP: dimetil ftalato

DiBP: diisobutil ftalato

DiNP: diisononil ftalato

DOHaD: do inglês, Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença

DCV: doença cardiovascular

E: dia embrionário

ETB: espongiotrofoblasto

EVT: células citotrofoblásticas extravilosas

FGF: fator de crescimento de fibroblasto

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GIP: grande para idade de prenhez

GSH: glutathiona reduzida

GSSH: glutathiona oxidada

GST: glutathiona S-transferase

GT: glutathionas totais

HE: hematoxilina e eosina

HPA: eixo hipotálamo-hipófise adrenal

HSD11b2: 11-beta hidroxisteroide desidrogenase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina 1

KOH: hidróxido de potássio

MCI: massa celular interna

MF: mistura de ftalatos

MNP – micros- e nanoplásticos

MMPs - metaloproteinases

MPs – microplásticos

NADPH - fosfato de dinucleotido de nicotinamida e adenina

NPs – nanoplásticos

PIP: pequeno para idade de prenhez

PIGF: fator de crescimento placentário

PPAR α : receptor ativador de proliferadores de peroxissoma alfa (α)

PPAR γ : receptor ativador de proliferadores de peroxissoma gamma (γ)

RCIU: restrição do crescimento intrauterino

SM: síndrome metabólica

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

STB: sinciciotrofoblasto

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

ZB: zona basal

ZL: zona do labirinto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das principais vias de exposição humana aos ftalatos e nanoplásticos, vias como inalação, ingestão e absorção dérmica. A absorção desses compostos e sua biodisponibilidade na corrente sanguínea possibilitam sua transferência através da barreira placentária, alcançando o embrião ou feto durante a gestação e causando impactos transgeracionais. Fonte: o próprio autor. Criado pelo app biorender.com. 18

Figura 2: Representação esquemática do conceito DOHaD e suas influências. Existem inúmeros fatores externos e ambientais que influenciam a qualidade do desenvolvimento fetal e da placentação. A hipótese DOHaD propõe que o ambiente no qual um indivíduo se expõe durante o desenvolvimento precoce, ou exposições a agentes tóxicos, produtos químicos ou poluentes, pode afetar sua sensibilidade ou risco de desenvolver doença e distúrbios reprodutivos mais tarde na vida. Entretanto, durante esse período crítico também podem ocorrer intervenções e mudanças positivas para que as oportunidades sejam aproveitadas para a promoção da saúde do indivíduo. 20

Figura 3: Representação esquemática da placenta de humanos (a) e de roedores (b), em sua forma madura. CTB, citotrofoblasto; STB, sinciciotrofoblasto; CGTs, células gigantes trofoblásticas; CGs, células trofoblásticas de glicogênio; ETB, espongiotrofoblasto. Fonte: adaptado de Hemberger, Hanna e Dean, 2020. 22

Figura 4: Representação esquemática da placenta de ratas, evidenciando os três compartimentos, as zonas labirinto e juncional/basal e a decídua materna. Ao lado, estrutura da barreira placentária formada por três camadas de células, uma camada de citotrofoblasto e duas de sinciciotrofoblasto. Além da representação da rota de translocação de partículas plásticas. A seta preta mostra a rota da partícula a ser transportada da circulação materna para a fetal. Fonte: adaptado de Medley et al., 2023. Criado pelo app biorender.com. 23

Figura 5: Representação esquemática da exposição aos nanoplásticos e ftalatos, as principais vias de exposição, e as consequências para o microambiente intestinal, como impactos na barreira epitelial, disbiose intestinal e imunotoxicidade. Fonte: adaptado de Hirt; Body-Malapel, 2020. 27

Figura 6: Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas e a composição da mistura de ftalatos (MF). O tratamento foi do dia gestacional

5 (DG5) até o DG20, por via oral. As ratas prenhes foram divididas em 6 grupos experimentais, grupo controle (C): recebeu óleo de milho/água (veículo), T1: recebeu 20µg/kg/dia da MF, T2: recebeu 200mg/kg/dia da MF, T3: recebeu 1mg/kg/dia de nanoesferas de poliestireno (NPs) 100 nm, T4: recebeu 20µg/kg/dia + 1mg/kg/dia de NPs, e T5: recebeu 200mg/kg/dia + 1mg/kg/dia de NPs. Ao final do período gestacional (DG20), as ratas foram eutanasiadas e os fetos, placentas, ovários e útero coletados para análises biométricas, histológicas e moleculares.40

Figura 7: Fotomicrografia representativa da placenta do grupo controle. Objetiva 20x e 40x. Abreviações: ZL, zona do labirinto; ZB, zona basal; Dec, decidua.48

Figura 8: Morfometria da placenta nos diferentes grupos experimentais, na prole feminina e masculina, representando a quantificação do comprimento relativo da Zona do Labirinto (**a,d**), Zona Basal (**b,e**) e Decídua (**c,f**). Teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando *p<0,05 comparado ao CTR.48

Figura 9: Gráficos representativos da expressão dos genes (**a**) *Ppar α* e (**b**) *Ppar γ*; a partir da análise por RT-qPCR. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{-\Delta\Delta CT}$ e os valores expressos pela média ± DP (n=5/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando **p<0,01 ou °p<0,06 comparado ao CTR.49

Figura 10: Gráficos representativos da expressão dos genes (**a**) *Vegf*, (**b**) *Igf-1*, (**c**) *Fgf* e (**d**) *Plgf*; a partir da análise por RT-qPCR. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{-\Delta\Delta CT}$ e os valores expressos pela média ± DP (n=5/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando *p<0,05 e **p<0,01 comparado ao CTR.50

Figura 11: Gráficos representativos da expressão dos genes (**a**) *Cyp11b1* e (**b**) *Hsd11b2*; a partir da análise por RT-qPCR. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{-\Delta\Delta CT}$ e os valores expressos pela média ± DP (n=5/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando p<0,05 comparado ao CTR.51

Figura 12: Gráficos representativos da expressão proteica de (**a**) VEGF, (**b**) IGF-1; a partir da análise por Western Blotting. A expressão das proteínas é dada pela densitometria de bandas, com as amostras e corridas representadas, assim como o endógeno (B-actina) e os pesos moleculares à direita. Os valores expressos pela média ± DP (n=5/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando *p<0,05 comparado ao CTR.52

Figura 13: Gráficos representativos do perfil oxidativo das placentas das ratas (**a**) concentração de TBARS, (**b**) atividade da SOD, (**c**) atividade da CAT e (**d**) glutational s-transferase. Os valores expressos pela média ± DP (n=5/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando *p<0,05 ou **p<0,01 comparado ao CTR.53

Figura 14: Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas e a composição da mistura de ftalatos (MF). O tratamento foi do dia gestacional 5 (DG5) até o DG20, por via oral. As ratas prenhes foram divididas em 6 grupos experimentais, grupo controle (C): recebeu óleo de milho/água (veículo), T1: recebeu 20µg/kg/dia da MF, T2: recebeu 200mg/kg/dia da MF, T3: recebeu 1mg/kg/dia de nanoesferas de poliestireno (NPs) 100 nm, T4: recebeu 20µg/kg/dia + 1mg/kg/dia de NPs, e T5: recebeu 200mg/kg/dia + 1mg/kg/dia de NPs. Ao final do período gestacional (DG20), as ratas foram eutanasiadas e os fetos isolados, pesados, e medidos com paquímetro digital as distâncias

crânio-caudal, encefálica e anogenital, e em seguida, foram colocados em fixadores para posterior análises viscerais e esqueléticas. 69

Figura 15: Gráfico representativo da distribuição do peso dos fetos (%) de acordo com a idade gestacional de fêmeas tratadas nos diferentes grupos. Teste de Fisher, significativo quando $**p < 0,01$ comparado ao CTR. PIP – pequeno para idade de prenhez; AIP – adequado para idade de prenhez; GIP – grande para idade de prenhez. 72

Figura 16: Gráficos representativos das DAGs relativas (distância anogenital (mm) dividida pela raiz cúbica da massa corporal (g)) da prole feminina (a) e masculina (b) nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos pela média $\pm$ DP; teste ANOVA, seguido de Tukey. O asterisco significa diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$ 73

Figura 17: Fotomicrografias de fetos de prole feminina coletados no DG20 para análise visceral e fixados em álcool absoluto, evidenciando os planos de cortes de acordo com Wilson 1965 e Barrow e Taylor 1969. Órgãos representados e destacados: M, medula; P, palato; SN, septo nasal; CN, cavidade nasal; BO, bulbo olfatório; C, cristalino; Co, córnea; R, retina; V, ventrículo; HC, hemisfério cerebral; D, diencéfalo; GS, glândula salivar; AA, artéria aorta; Pu, pulmão; E, esôfago; Cor, coração; VCI, veia cava inferior; GA, glândula adrenal; F, fígado; Duo, duodeno; Es, estômago; GAE, glândula adrenal esquerda; RE, rim esquerdo; OvD, ovário direito; Ure, ureter; GAD, glândula adrenal direita; RD, rim direito; OvE, ovário esquerdo; U, útero. 74

Figura 18: Fotomicrografias de fetos de prole masculina coletados no DG20 para análise visceral e fixados em álcool absoluto, evidenciando os órgãos viscerais. Órgãos representados e destacados como nas fotos das fêmeas. Tr, traqueia; GS, glândula salivar; R, rim; Es, estômago; F, fígado; Duo, duodeno; RE, rim esquerdo; RD, rim direito; Pa, pâncreas; Ep, epidídimo; Re, reto; T, testículo; B, bexiga. 74

Figura 19: Fotomicrografias de fetos de prole feminina coletados no DG20 e fixados em Alizarina Red para análise esquelética. Órgãos representados e destacados, Ra, rádio; Um, Ulna; Um, úmero; Me, metacarpos; V, volmer; Pal, palato; BF, basisfenoide; BO, basoccipital; N, nasal; F, frontal; P, parietal; IP, íterparietal; VC, vértebras cervicais; VT, vértebras torácicas; VL, vértebras lombares; VS, vértebras sacrais; VC; vértebras caudais; Co, costelas; Fê, fêmur; Ti, tibia; Fi, fíbula. 75

Figura 20: Fotomicrografias de fetos de prole masculina coletados no DG20 e fixados em Alizarina Red para análise esquelética como nas fotos das fêmeas. Órgãos representados e destacados, Me: metatarsos; Ra, rádio; Um, Ulna; Um, úmero; V, volmer; Pal, palato; BF, basisfenoide; BO, basoccipital; VC, vértebras cervicais; VT, vértebras torácicas; VL, vértebras lombares; VS, vértebras sacrais; VC; vértebras caudais; Co, costelas; Fê, fêmur; Ti, tibia; Fi, fíbula. 75

Figura 21: Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas e a composição da mistura de ftalatos (MF). O tratamento foi do dia gestacional 5 (DG5) até o DG20, por via oral. As ratas prenhes foram divididas em 6 grupos experimentais. Ao final do período gestacional (DG20), as ratas foram eutanasiadas e as fezes foram coletadas e armazenadas em tubos estéreis até o momento do processamento das amostras, amplificação do DNA e sequenciamento para análise da composição do microbioma. 85

Figura 22: Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas e a composição da mistura de ftalatos (MF). O tratamento foi do dia

gestacional 10 (DG10) até o dia pós-natal 21 (DPN21), por via oral. As ratas prenhes foram divididas em 6 grupos experimentais. Ao final do período lactacional (DPN21), os filhotes foram separados das mães e os machos no DPN22 foram eutanasiados e as fezes foram coletadas e armazenadas em tubos estéreis até o momento do processamento das amostras, amplificação do DNA e sequenciamento para análise da composição do microbioma.85

Figura 23: Gráficos representativos da distribuição do microbioma materno cecal, referentes ao delineamento 1, nos níveis de filo (**a**), classe (**b**) e ordem (**c**). Dados apresentados como média $\pm$ DP (n=4-5/grupo). Teste ANOVA, seguido de Tukey.88

Figura 24: Gráficos representativos da distribuição do microbioma materno cecal, referentes ao delineamento 1, na classe *Bacilli* (**a**), e nas ordens *Bacillales* (**b**) e *Lactobacillales* (**c**). Dados apresentados como média $\pm$ DP (n=4-5/grupo). Teste ANOVA, seguido de Tukey. A diferença foi considerada estatisticamente significativa em relação ao CTR quando $*p<0,05$89

Figura 25: Gráficos representativos da distribuição do microbioma de ratos machos pós-desmame (DPN22), referentes ao delineamento 2, nos níveis de filo (**a**), classe (**b**) e ordem (**c**). Dados apresentados como média $\pm$ DP (n=4-5/grupo). Teste ANOVA, seguido de Tukey.90

Figura 26: Gráficos representativos do Índice de Shannon, definido pela diversidade alfa, do microbioma materno (DG20) (**a**) e de ratos machos pós-desmame (DPN22) (**b**). Dados apresentados como média $\pm$ DP (n=4-5/grupo). Teste ANOVA, seguido de Tukey.91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros reprodutivos e de pesos maternos. Valores expressos média $\pm$ DP (n = 7/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando $p<0,05$ comparado ao CTR. Para as taxas de perdas foi feito teste de Fisher; e significativo quando $*p<0,05$ ou $**p<0,01$ comparado ao CTR.46

Tabela 2: Parâmetros placentários por ninhada. Valores expressos média $\pm$ DP; teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando $*p<0,05$ comparado ao CTR.47

Tabela 3: Parâmetros embriofetais por ninhada. Valores expressos média $\pm$ DP; teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando $*p<0,05$ comparado ao CTR.72

Tabela 4: Sequência dos primers usados para a análise de RT-qPCR, contendo os códigos de acesso dos alvos analisados (GenBank).98

Sumário

CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA	16
1. PLÁSTICOS, ADITIVOS E NANOPLÁSTICOS	16
2. DOHAD E DESREGULADORES ENDÓCRINOS	19
3. PLACENTA E O DESENVOLVIMENTO FETAL.....	21
4. MICROBIOTA INTESTINAL	25
5. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	27
6. OBJETIVO GERAL	28
7. REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2: ALTERAÇÕES MATERNAS E PLACENTÁRIAS	36
<i>Efeitos da exposição materna a uma combinação de ftalatos e nanoplásticos na morfofisiologia placentária e no perfil oxidativo.....</i>	<i>36</i>
1. INTRODUÇÃO	36
2. OBJETIVO.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4. RESULTADOS.....	46
5. DISCUSSÃO.....	53
6. REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 3: PARÂMETROS E ALTERAÇÕES BIOMÉTRICAS DA PROLE.....	66
<i>Exposição aos plásticos durante a gestação de ratas e os efeitos no desenvolvimento e na programação fetal: uma abordagem DOHaD</i>	<i>66</i>
1. INTRODUÇÃO	66
2. OBJETIVO.....	67
3. MATERIAIS E MÉTODOS	67
4. RESULTADOS.....	71
5. DISCUSSÃO.....	76
6. REFERÊNCIAS	78
CAPÍTULO 4: ANÁLISE DO MICROBIOMA INTESTINAL MATERNO E FETAL	81
<i>Impactos na composição do microbioma de ratos após a exposição gestacional e lactacional aos ftalatos e nanoplásticos.....</i>	<i>81</i>
1. INTRODUÇÃO	81
2. OBJETIVO.....	83
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	83
4. RESULTADOS.....	87
5. DISCUSSÃO.....	91

CONCLUSÃO.....	94
RESUMO GRÁFICO DOS RESULTADOS DESTE TRABALHO.....	95
6. REFERÊNCIAS	96
ANEXOS	98
ANEXO 1: Lista de primers utilizados no RT-qPCR	98
ANEXO 2: Certificado CEUA	99

CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

1. PLÁSTICOS, ADITIVOS E NANOPLÁSTICOS

O uso de plástico tem aumentado constantemente desde sua produção em larga escala a partir de meados da década de 50 do século passado. Estima-se que a produção global tenha alcançado 8,9 bilhões de toneladas (Geyer; Jambeck; Law, 2017), e somente em 2022, esse número chegou a aproximadamente 400,9 milhões de toneladas (PLASTICS EUROPE, 2022). Devido à facilidade, baixo custo e durabilidade, a produção em massa de itens plásticos e sua utilização aumentam a cada ano, criando-se uma cultura de produção em massa de lixo plástico. O descarte incorreto desses polímeros se acumula em ecossistemas aquáticos e terrestres, afetando o meio ambiente e a vida dos seres humanos (Barnes et al., 2009; Landrigan et al., 2020). Conforme o plástico, disperso no ambiente, se fragmenta em partículas menores, forma os microplásticos e nanoplásticos, que se tornam uma grande preocupação tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente. À medida que essas partículas se infiltram em diversos microambientes, há um crescente interesse em entender os possíveis impactos que podem ter sobre o corpo humano e o meio ambiente em escala mundial (Wagner; Reemtsma, 2019).

Os resíduos plásticos, quando eliminados e expostos a outros componentes, decompõem-se em enormes quantidades de microplásticos (medindo $<5\ \mu\text{m}$) e nanoplásticos ($\leq 100\ \text{nm}$) (Gigault et al., 2018; Song et al., 2017). Uma única partícula de microplástico (MPs) pode se decompor em bilhões de partículas de nanoplástico (NPs), sugerindo que a poluição por nanoplásticos, provavelmente, é predominante em todo o mundo (Gigault et al., 2016; Hernandez; Yousefi; Tufenkji, 2017). Diversos estudos analisaram os efeitos do aumento da poluição por micro e nanoplásticos (MNPs) em todo o mundo e evidenciaram que aproximadamente 5 a 13 milhões de toneladas de detritos plásticos entram no ecossistema marinho a cada ano (Nabi et al., 2022). Isso destaca a necessidade de um maior entendimento e investigação sobre os nanoplásticos e seus potenciais efeitos na saúde de humanos e animais.

A exposição aos MNPs em humanos pode ocorrer através da ingestão de água e produtos alimentares contaminados com plástico ou por inalação de ar poluído com plástico (Figura 1) (Prata et al., 2020). Os MNPs têm sido identificados em uma variedade de fontes, incluindo frutos do mar (peixe, camarão e mexilhões), produtos domésticos (sal marinho, mel, açúcar e

sacos de chá), água da torneira, água engarrafada, cervejas, locais de construção civil, fábricas e terrenos agrícolas (Barboza; Vieira; Guilhermino, 2018; Hernandez; Yousefi; Tufenkji, 2017). Essa detecção generalizada de plásticos destaca a extensão da contaminação por plástico no meio ambiente e na cadeia alimentar. Além disso, acredita-se que os nanoplásticos ($\leq 100\text{nm}$) podem atravessar a barreira dérmica devido ao seu tamanho, rota associada normalmente a monômeros e aditivos dos plásticos como os ftalatos (Prata et al., 2020). E, por serem menores, os NPs possuem maior facilidade em sua absorção pelo trato gastrointestinal e são capazes de atravessar membranas biológicas importantes (Banerjee; Shelper, 2021; Kannan; Vimalkumar, 2021), causando alterações no sistema genital masculino e feminino, sistema endócrino (ex.: adrenal e tireoide), e sistema nervoso (Leso et al., 2023; Ullah et al., 2023).

A presença de partículas de plásticos na placenta humana foi descrita pela primeira vez por Ragusa e colaboradores em 2021 (Ragusa et al., 2021). Em gestantes, os microplásticos têm a capacidade de entrar na corrente sanguínea e chegar à placenta através do sistema respiratório materno e do trato gastrointestinal (Arumugasaamy et al., 2019). Mesmo que os mecanismos precisos que os MNPs usam para cruzar a placenta ainda não estejam esclarecidos, quando os MNPs atingem a superfície materna da placenta, eles podem penetrar nos tecidos mais profundos por meio de vias de transporte, tanto ativas quanto passivas (Medley et al., 2023; Tetro et al., 2018). Ademais, em um estudo recente com camundongos machos e fêmeas, a administração de MPs (0,5 e 2mg de MPS por 90 dias) induziu toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento, ao reduzir o peso corporal dos filhotes, o número de fetos nascidos vivos por mãe e a proporção sexual dos filhotes (Park et al., 2020).

Além disso, a extensa área de superfície hidrofóbica dos MNPs torna-os eficazes em carrear outras partículas poluentes, como os desreguladores endócrinos (DEs), ftalatos, metais pesados e outros produtos químicos (Deng et al., 2020). Essas substâncias associadas podem causar danos à saúde dos mamíferos, principalmente dos seres humanos, por meio de processos de bioacumulação e biomagnificação (Ullah et al., 2023). Dentre esses compostos, os ftalatos, ou diésteres de ácido ftálico, são amplamente utilizados como plastificantes para conferir maior maleabilidade e flexibilidade em diversos produtos de plástico de cloreto de polivinilo, como brinquedos, cosméticos, recipientes de alimentos e dispositivos hospitalares (Wang; Zhu; Kannan, 2019). Por causa de sua estrutura química, os ftalatos são facilmente liberados para o ambiente, o que contribui para sua presença generalizada. Classificados como DEs, os ftalatos têm sido especialmente estudados por sua atividade antiandrogênica (Radke et al., 2018), e

assim, a maior parte dos estudos avaliam o papel da exposição ao ftalato em aspectos reprodutivos, metabólicos e neurológicos.

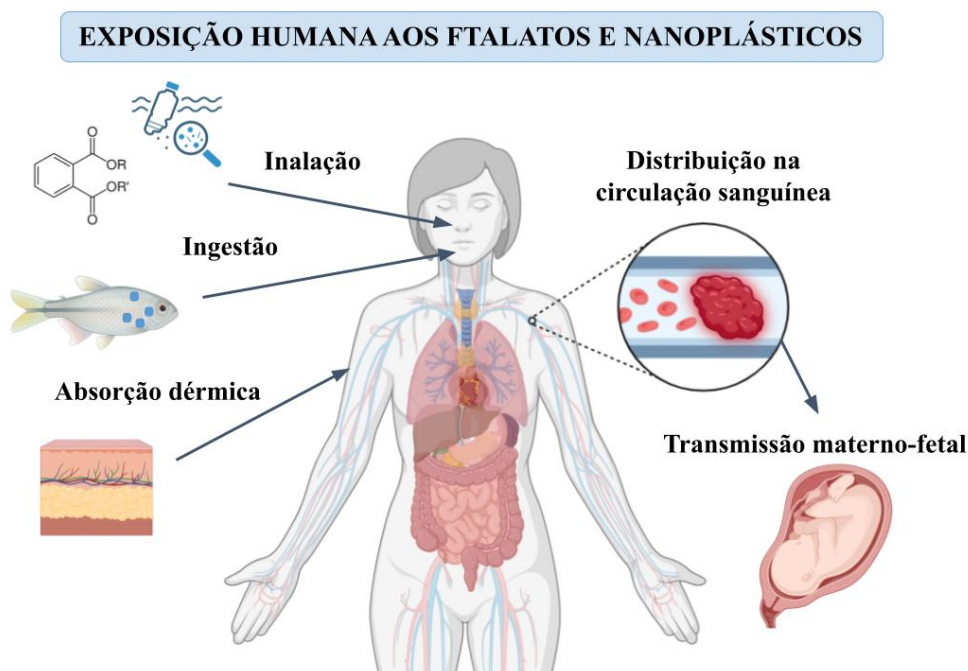


Figura 1: Representação esquemática das principais vias de exposição humana aos ftalatos e nanoplásticos, vias como inalação, ingestão e absorção dérmica. A absorção desses compostos e sua biodisponibilidade na corrente sanguínea possibilitam sua transferência através da barreira placentária, alcançando o embrião ou feto durante a gestação e causando impactos transgeracionais. Fonte: o próprio autor. Criado pelo app biorender.com.

A literatura mostra que, em roedores, há provas suficientes que a exposição ao ftalato provoca toxicidades reprodutivas e de desenvolvimento. Nos seres humanos, as alterações de dimorfismo no trato genital, observados em lactentes do sexo masculino, foram significativamente associados à exposição pré-natal a ftalatos (Swan et al., 2005). Já em modelos animais, a distância anogenital (DAG) tem se revelado um marcador altamente sensível para avaliar a desmasculinização do trato genital masculino. Essa métrica é utilizada para monitorar os efeitos de substâncias potencialmente disruptivas ao desenvolvimento sexual. Diversos estudos epidemiológicos mostraram que meninos, cujas mães apresentaram níveis elevados de ftalato na urina durante a gravidez, frequentemente exibem uma DAG reduzida, sugerindo uma possível influência antiandrogênica dos ftalatos (Swan et al., 2015; Radke et al., 2018).

Estudos toxicológicos prévios têm se concentrado principalmente na avaliação dos efeitos dos ftalatos de forma isolada. No entanto, é importante considerar que os seres humanos e animais estão expostos a misturas de diferentes ftalatos (Ferguson et al., 2014; Meeker; Ferguson, 2014; Watkins et al., 2014). Em Illinois, nos Estados Unidos, um estudo determinou

a concentração dos 6 principais metabólitos de ftalatos na urina de gestantes. Esses metabólitos incluíram: 21% DEHP (di-2-etilhexil ftalato), 35% DEP (dietil ftalato), 15% DBP (di-n-butil ftalato), 8% DiBP (diisobutil ftalato), 5% BBzP (butil benzil ftalato), e 15% DiNP (diisononil ftalato). O estudo visou determinar as proporções dos diferentes ftalatos aos quais os fetos estão expostos indiretamente durante a gestação (Zhou; Gao; Flaws, 2017). Esse estudo mostrou uma visão mais realista da exposição materna aos ftalatos, ao refletir condições similares da exposição observadas no cotidiano. Isso proporciona uma maior compreensão da exposição no período gestacional, destacando como esses produtos afetam o desenvolvimento fetal. Além disso, esses resultados podem aprimorar futuras investigações e desenvolver estratégias de prevenção mais eficazes para mitigar os riscos associados aos DEs.

2. DOHAD E DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Estudos com a finalidade de explicar a associação entre o ambiente, o desenvolvimento embriofetal alterado e a fisiopatologia ao longo da vida se enquadram no conceito DOHaD, traduzido como “Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença” (Barker et al., 1989; Roseboom; Watson, 2012). Essa hipótese derivou-se da teoria de Barker, postulado na década de 80, no qual estabelece que o ambiente nutricional, hormonal e metabólico fornecido pela mãe pode ter um efeito permanente na estrutura e fisiologia da sua prole (Barker et al., 1989; Barker; Osmond, 1986). Ainda, exposições a agentes tóxicos, como produtos químicos e poluentes, ou desreguladores endócrinos, antes ou logo após o nascimento, podem programar o indivíduo para ter um risco aumentado em desenvolver doenças e ter malefícios para a saúde adulta (Zhang; Ho, 2011).

No contexto DOHaD, as janelas de suscetibilidade se referem aos períodos críticos do desenvolvimento, no qual o organismo em questão está suscetível e exposto a diferentes ambientes, modulando a suscetibilidade/risco de desenvolver doenças mais tardes na vida. Entretanto, quando decidimos mudar o foco, surge o conceito de "janelas de oportunidades", as quais podem ser vistas como os períodos em que intervenções e ações podem ter impactos positivos e transformadores (BARKER et al., 1989; JAIN, 2020). Ambos os conceitos postulam que o ambiente no qual o indivíduo está inserido, seja favorável ou hostil, modulam a saúde e o bem-estar ao longo da vida. Essas janelas são marcadas por uma sensibilidade aumentada, onde o organismo está mais receptivo a influências externas, sejam elas nutricionais, ambientais ou comportamentais (Figura 2).

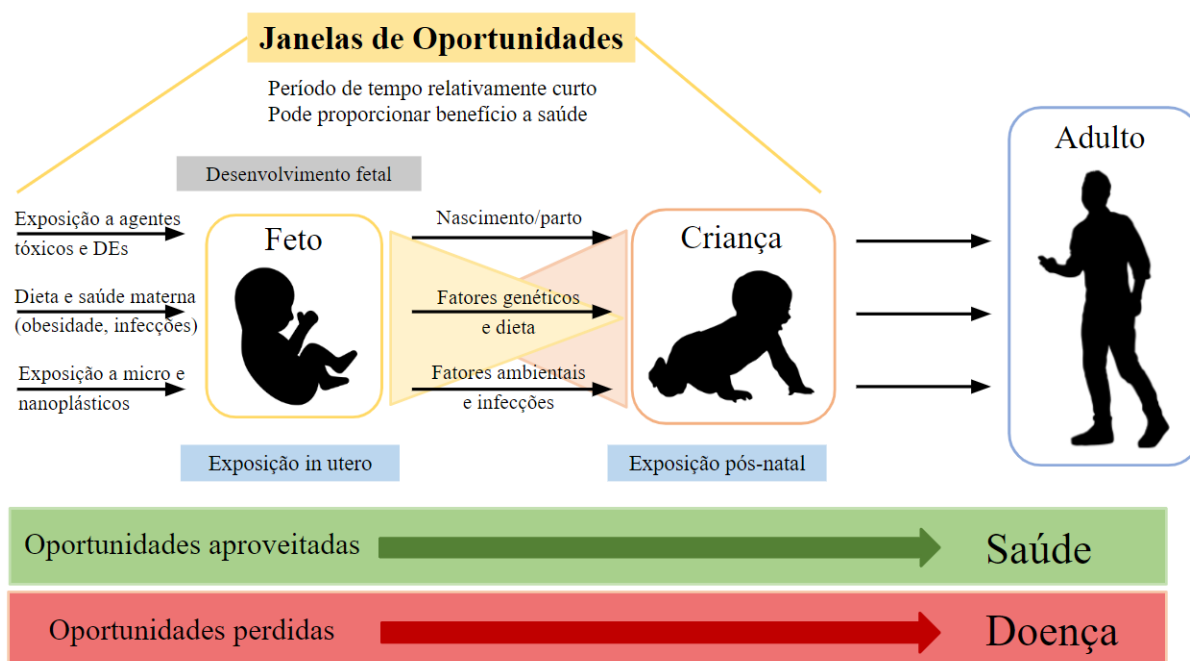


Figura 2: Representação esquemática do conceito DOHaD e suas influências. Existem inúmeros fatores externos e ambientais que influenciam a qualidade do desenvolvimento fetal e da placentação. A hipótese DOHaD propõe que o ambiente no qual um indivíduo se expõe durante o desenvolvimento precoce, ou exposições a agentes tóxicos, produtos químicos ou poluentes, pode afetar sua sensibilidade ou risco de desenvolver doença e distúrbios reprodutivos mais tarde na vida. Entretanto, durante esse período crítico também podem ocorrer intervenções e mudanças positivas para que as oportunidades sejam aproveitadas para a promoção da saúde do indivíduo.

Desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, presentes no meio ambiente que interferem no sistema endócrino dos organismos, podendo alterar a biossíntese, armazenamento, transporte, atividade ou eliminação de hormônios endógenos (Yoon et al., 2014). Essas substâncias são capazes de afetar diversos processos fisiológicos regulados pelos hormônios, como crescimento, desenvolvimento, reprodução, metabolismo e resposta imunológica. Os DEs, amplamente usados em diversas indústrias no mundo todo, incluem muitos produtos químicos, como ftalatos, fenóis, metais pesados, pesticidas, entre outros (Liu et al., 2024). Os seres humanos podem ser expostos aos DEs de diversas maneiras, incluindo a ingestão de alimentos contaminados, o contato com produtos químicos, ou a inalação de partículas (Yilmaz et al., 2020).

Durante o período gestacional, é essencial que haja uma ação hormonal correta para garantir o crescimento adequado de tecidos e órgãos. No entanto, gestantes e bebês são expostos diariamente a produtos químicos, incluindo os DEs (Thomas Zoeller et al., 2012; Fisher et al., 2016). Essa exposição, num momento crucial, pode afetar o equilíbrio hormonal e o feto em desenvolvimento, cuja sensibilidade a essas substâncias é alta (Choudhary et al., 2003; Murphy et al., 2006). Além disso, alguns desreguladores endócrinos podem se acumular em tecidos

placentários e prejudicar sua função (Marsit, 2016; Liu et al., 2024). Já foi descrito na literatura associação entre a exposição a DEs e diversas alterações metabólicas e reprodutivas (Brehm; Flaws, 2019; Guarnotta et al., 2022; Hirke et al., 2023; Pan et al., 2024), interferências na microbiota (Calero-Medina et al., 2023) e distúrbios no neurodesenvolvimento (Özel; Rüegg, 2023). É importante ressaltar que os efeitos adversos dos DEs sobre a saúde reprodutiva e gestacional podem depender do tipo, dose e período de exposição.

3. PLACENTA E O DESENVOLVIMENTO FETAL

A placenta é um órgão transitório encontrado apenas em mamíferos e é responsável por desempenhar inúmeras funções cruciais para o desenvolvimento e o crescimento fetal. Além de ser responsável por ancorar o conceito na parede uterina, é o local onde ocorre as trocas fisiológicas entre a mãe e o feto, e a produção de hormônios, que irão atuar na regulação das adaptações maternas diante da gravidez (Fowden et al., 2009; Sandovici et al., 2012; Turco; Moffett, 2019). Além disso, fornece proteção imunológica através dos anticorpos maternos, e expressa diversos receptores de esteroides e transportadores de glicose que irão auxiliar no desenvolvimento fetal (Fowden et al., 2015a). Condições adversas durante o desenvolvimento inicial podem trazer consequências na vida adulta da prole, e podem não se limitar apenas a uma geração. Por isso, estudos recentes ressaltam a importância de uma melhor compreensão acerca da placenta, visto que alterações estruturais e moleculares podem comprometer a saúde e a doença a longo prazo, tanto para a mãe quanto para a sua prole (Roseboom; Watson, 2012). Nesse sentido, este período representa uma janela de suscetibilidade, nas quais as interações multidirecionais entre o feto, a placenta e a mãe definem o sucesso da implantação e do desenvolvimento materno-fetal.

Os roedores servem como um ótimo modelo experimental para estudar o desenvolvimento da placenta humana, já que os estudos em humanos são limitados pela incapacidade de fazer interferências experimentais e baseiam-se em exames pós-parto (Serman; Serman, 2011; Sandovici et al., 2012; Guttmacher; Maddox; Spong, 2014). É importante ressaltar que, mesmo que a morfologia da placenta humana e de ratos difiram (Figura 3), em ambas as espécies, a placenta é discoide, hemocorial e corioalantoidea. Além disso, o desenvolvimento placentário em ambos é bastante semelhante, e por isso, cada vez mais a placenta de roedores tem sido usada como modelo experimental. Enquanto os seres humanos possuem períodos de gestação mais longos e dão à luz, normalmente, a um único bebê, os roedores possuem período de gestação curto e têm uma ninhada com vários filhotes (Turco; Moffett, 2019).

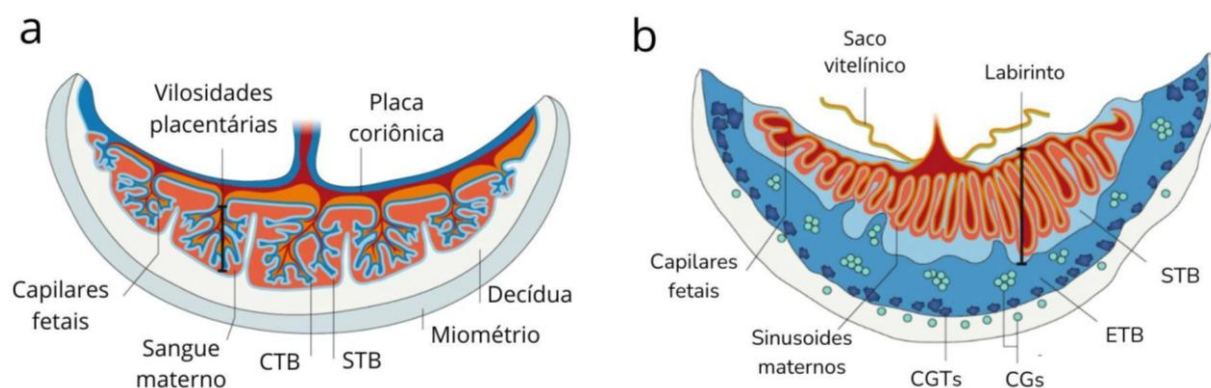


Figura 3: Representação esquemática da placenta de humanos (a) e de roedores (b), em sua forma madura. CTB, citotrofoblasto; STB, sinciotrofoblasto; CGTs, células gigantes trofoblásticas; CGs, células trofoblásticas de glicogênio; ETB, espongiotrofoblasto. Fonte: adaptado de Hemberger, Hanna e Dean, 2020.

A íntima relação dos tecidos maternos e embrionários inicia-se com a implantação do blastocisto no endométrio, que ocorre em três etapas: a aposição, contato do blastocisto com o epitélio uterino; a adesão, reconhecimento de moléculas na superfície e, por fim, a invasão (Abrahamsohn; Zorn, 1993). No início da implantação no blastocisto há o estabelecimento da polaridade celular constituída por células “internas”, representada pela massa celular interna (MCI) e células “externas”, representada pelo trofoectoderma. Logo após, a MCI se separa no epiblasto e no endoderma primitivo (hipoblasto), que irão formar o embrião propriamente dito e o saco vitelínico, respectivamente (Hemberger; Hanna; Dean, 2020). Em ratos, as células trofoblásticas gigantes (CTG) primárias, formadas a partir do trofoblasto blastocístico (trofoectoderma), fazem a invasão do endométrio e liberam enzimas proteolíticas para degradar a matriz extracelular e se instalar nesse espaço para desenvolver o aporte nutricional inicial do embrião (Bevilacqua; Abrahamsohn, 1989; Watson; Cross, 2005). Então, as CTGs, derivadas do trofoectoderma que não está em contato com a massa celular interna, são análogas às células citotrofoblásticas extravilosas (EVTs) em humanos. Já as células do trofoectoderma que estão adjacentes à massa celular interna formam dois tipos celulares, o ectoderma extraembrionário, que formará as células trofoblásticas do córion e depois o labirinto; e o cone ectoplacentário (CEP) (Abrahamsohn; Zorn, 1993; Hemberger; Watson; Cross, 2005; Hanna; Dean, 2020). Também, nesse período da janela de implantação, a invasão do trofoblasto ao endométrio induz a reação decidual nesse tecido, com influência hormonal de estrogênio e progesterona, se tornando mais espesso e altamente vascularizado, agora chamado de decídua. Esse tecido apresenta um papel importante na síntese de hormônios como prolactina e prostaglandinas esteroides, bem como no armazenamento de energia em forma de glicogênio e lipídeos (Cha; Sun; Dey, 2012).

Na gastrulação de roedores, que se inicia no dia embrionário (E) 6,5, é gerado o mesoderma extraembrionário a partir do epiblasto. Esse mesoderma formará o alantoide e as camadas mesodérmicas extraembrionárias do âmnio e do córion (Hemberger; Hanna; Dean, 2020). Em seguida, a junção corioalantoidea, responsável pela relação hemocorial, inicia o desenvolvimento da placenta, seguido pela ramificação de vilosidades e vascularização do trofoblasto, formando o labirintotrofoblasto (Watson; Cross, 2005). Isso gera um rearranjo dos tecidos, para estabelecer, posteriormente, os compartimentos da placenta madura. O labirinto é sustentado pela zona basal/juncional, compostas por espongiotrofoblastos, uma camada de células derivadas do CEP (Rossant; Cross, 2001). No oitavo dia de prenhez, células do trofoectoderma formam o CEP, entre a decídua mesometrial e o embrião. As células do CEP invadem a decídua, se proliferam e diferenciam, na região basal, em tipos específicos de CTGs, como as células trofoblásticas gigantes de glicogênio. Enquanto isso, a decídua se diferencia e se irradia pelo útero. No décimo primeiro dia, são observadas as regiões da zona juncional/basal, zona do labirinto e decídua basal. No décimo quarto dia, a placenta madura apresenta sua morfologia definitiva e CTGs já diferenciadas (Watson; Cross, 2005; Hemberger; Hanna; Dean, 2020). Portanto, a placenta de roedores é dividida em dois compartimentos fetais, as zonas juncional/basal e do labirinto, e um compartimento materno, a decídua basal (Figura 4) (Takata et al., 1997; Sandovici et al., 2012, Medley et al., 2023).

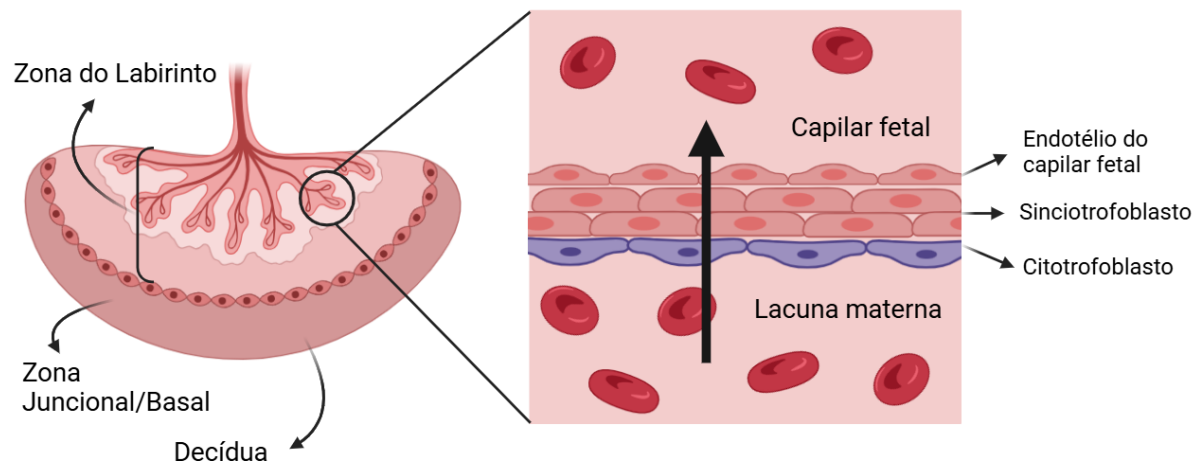


Figura 4: Representação esquemática da placenta de ratos, evidenciado os três compartimentos, as zonas labirinto e juncional/basal e a decídua materna. Ao lado, estrutura da barreira placentária formada por três camadas de células, uma camada de citotrofoblasto e duas de sinciotrofoblasto. Além da representação da rota de translocação de partículas plásticas. A seta preta mostra a rota da partícula a ser transportada da circulação materna para a fetal. Fonte: adaptado de Medley et al., 2023. Criado pelo app biorender.com.

A região do labirinto é formada pelas lacunas maternas, septos trofoblásticos e capilares

fetais, e é responsável por fornecer um ambiente para as trocas de oxigênio e nutrientes entre a circulação materna e fetal. Os septos trofoblásticos são compostos por três camadas distintas de células, uma camada de citotrofoblasto e duas camadas de sinciciotrofoblasto (Figura 4), que formam uma barreira através da qual as substâncias devem atravessar para alcançar o sangue fetal, e por isso a placenta de roedores é classificada como hemotricorial (Hemberger; Hanna; Dean, 2020).

A morfogênese do labirinto é um período crucial para o desenvolvimento da placenta e depende de várias vias de sinalização intercelular, pois sem um labirinto bem desenvolvido e devidamente vascularizado, resulta numa má difusão de oxigênio e nutrientes, e possivelmente na interrupção da gestação (Serman; Serman, 2011). Além da sinalização de proteínas, os receptores nucleares, incluindo o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR), são essenciais para a morfogênese do labirinto (Watson; Cross, 2005). Durante a organogênese, o PPAR γ , presente nas células trofoblásticas, exercem funções críticas no desenvolvimento placentário, visto que alterações nas vias de sinalização dessa molécula pode levar a malformações congênitas (Jawerbaum; Capobianco, 2011). Alguns fatores de crescimento e de angiogênese como o FGF (fator de crescimento de fibroblasto), o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1), o PlGF (fator de crescimento placentário), o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), são essenciais para a formação de uma placenta funcional e para a continuação da gestação (Artoni et al., 2007; Corêa et al., 2012). Além disso, durante toda a gestação, a placenta passa por um intenso processo proliferativo e sua regulação é baseada no equilíbrio de fatores promotores e inibidores do ciclo celular (Correia-Da-Silva et al., 2004).

A região adjacente ao labirinto é a zona basal, ou juncional, a qual compreende os espongiotrofoblastos, as células de glicogênio e as células trofoblásticas gigantes (Watson; Cross, 2005). Os espongiotrofoblastos, células ovóides e mononucleares, possuem função endócrina, pois mantêm a secreção de progesterona do corpo lúteo, além de regular o crescimento do endotélio fetal na placenta pela secreção de fatores angiogênicos (Silva; Serakides, 2016). Como explicado anteriormente, há duas populações de CTGs distintas durante o desenvolvimento placentário: as CTGs primárias, derivadas do trofoectoderma e responsáveis pela invasão do endométrio e a degradação da matriz extracelular, possuem função fagocítica, mas não são constituintes da zona basal; e as CTGs secundárias, derivadas do CEP, as quais possuem abundância de citoplasma, núcleo gigante e poliploides, e são importantes para a formação da interface entre o sangue materno e o sangue fetal. Além disso, essas duas

populações de células produzem muitas citocinas e hormônios essenciais para o fluxo sanguíneo e regulação de respostas maternas, além de possuírem uma especialização imunológica por não exibirem determinantes do complexo principal de histocompatibilidade em suas membranas (Silva; Serakides, 2016). Por fim, as células de glicogênio possuem núcleos mais condensados e grânulos de glicogênio no citoplasma, e representam a maior parte da zona basal no DG14. Importantes para o controle hormonal da gestação e como fontes de energia no final do desenvolvimento fetal, pois a partir do DG17 começam a se degradar até o final da gestação, no qual se encontra o maior crescimento intrauterino (Sferruzzi-Perri et al., 2009).

A placenta, portanto, é um órgão multifuncional que regula a transferência de nutrientes e diversas substâncias, como xenobióticos, entre a mãe e o feto (Serman; Serman, 2011). Vários metabólitos, toxinas e hormônios, presentes na circulação materna, conseguem atravessar a membrana placentária, expondo o feto em desenvolvimento (Bräuner et al., 2022). Diferentes estudos evidenciaram a relação entre exposições ambientais durante a vida fetal e várias condições adversas crônicas na vida da prole, chamando a atenção para as condições iniciais do desenvolvimento e impactos permanentes nos organismos (Barker et al., 1989; Calkins; Devaskar, 2011; Skogen; Øverland, 2012).

4 MICROBIOTA INTESTINAL

O microbioma intestinal é um ecossistema de microrganismos que habitam o intestino, representando os genomas coletivos de todos os microrganismos encontrados nesta região (Hills et al., 2019). A microbiota, que é a comunidade desses microrganismos, desempenha funções essenciais para a manutenção fisiológica do corpo humano. Um dos principais benefícios da microbiota é a fermentação de fibras alimentares, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como butirato, propionato e acetato (Adak; Khan, 2019). Esses compostos são fundamentais para a saúde do epitélio intestinal, pois fornecem energia para as células intestinais, promovendo sua regeneração e manutenção. Além disso, os AGCC ajudam a fortalecer a barreira intestinal, que controla a passagem de nutrientes e medicamentos para a corrente sanguínea (Morrison; Preston, 2016; Valdes et al., 2018; Adak; Khan, 2019). A microbiota também influencia o sistema imunológico, auxiliando as células imunológicas a promover uma resposta adequada a patógenos enquanto evita reações exageradas a substâncias inofensivas, como os alérgenos (García-Montero et al., 2021).

Em relação a interação da microbiota e sistema neuroendócrino, estipulada por meio do eixo intestino-cérebro, a microbiota pode produzir neurotransmissores e outras moléculas

sinalizadoras que influenciam o humor e o comportamento (Kuwahara et al., 2020). Como é o caso da serotonina, um neurotransmissor produzido por bactérias que afeta o bem-estar emocional (García-Montero et al., 2021). Além disso, as interações entre a microbiota e o sistema nervoso podem modular respostas ao estresse e influenciar condições como ansiedade e depressão (Stinson, 2020). Diversos estudos mostram que, mesmo que a composição da microbiota possua um fator genético, é muito influenciada por fatores ambientais relacionados à dieta, medicamentos e estilo de vida (Valdes et al., 2018; Hills et al., 2019).

Os microrganismos intestinais são essenciais para muitos aspectos da saúde humana, incluindo características imunológicas, metabólicas e neurológicas (Valdes et al., 2018). Dessa forma, visto toda a importância da microbiota, as alterações que acometem a composição e diversidade da microbiota como a disbiose são associadas à uma série de doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, doença inflamatória intestinal (DII), diabetes tipo 2 (DM2), síndrome metabólica (SM), doença cardiovascular (DCV), doenças autoimunes e até câncer colorretal (Valdes et al., 2018; Hills et al., 2019), afetando a saúde do indivíduo. Além disso, a microbiota intestinal de mulheres gestantes pode afetar o desenvolvimento do feto (Stinson, 2020). A disbiose pode causar inflamação sistêmica, que pode comprometer a placenta e afetar a nutrição fetal, resultando em um fornecimento inadequado de nutrientes essenciais, como vitaminas e minerais cruciais para o desenvolvimento do feto (Stinson, 2020; Sarkar et al., 2021). Outro ponto importante é a relação da saúde da microbiota com a regulação do sistema imunológico, e assim, uma microbiota desequilibrada pode aumentar o risco de infecções e doenças autoimunes na mãe, o que pode ter consequências diretas sobre a saúde do feto (Basak; Varma; Duttaroy, 2023).

A literatura descreve a disbiose taxonômica como uma redução quantitativa ou qualitativa da composição da microbiota intestinal (Kriss et al., 2018). O microambiente intestinal, tanto humanos quanto em roedores, observamos os principais filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, e a proporção de Firmicutes e Bacteroidetes é considerada um marcador preditivo de saúde e doenças não transmissíveis, como as mencionadas acima (Mariat 2009), dois filos que juntos representam mais de 90% da população bacteriana total.

Interessantemente, o intestino não é só o principal órgão de acúmulo de micro e nanoplasticos (MNPs), mas também o ambiente intestinal é muito suscetível à liberação de outras substâncias, como aditivos, de microplásticos (Figura 5) (Jin et al., 2019). Os desreguladores endócrinos têm sido associados a diversas alterações e distúrbios metabólicos, o que influencia na composição e função da microbiota intestinal (Galvez-Ontiveros et al.,

2020). Alguns estudos associaram os efeitos dos DEs na microbiota intestinal e o aumento do risco de distúrbios metabólicos, como obesidade (Malaisé et al., 2017). Lei e colaboradores (2019), após exposição oral ao DEHP em camundongos, observaram a alteração da composição da microbiota intestinal, afetando diretamente a produção de metabólitos bacterianos relacionados a distúrbios no neurodesenvolvimento (Lei et al., 2019). Também já foram descritas exposições a MNPs e seus efeitos adversos no microbioma intestinal de roedores, assim como relatado em um estudo com camundongos, na qual a exposição aos MPs durante 8 semanas na vida adulta resultou em um acúmulo excessivo e induziu inflamação e danos mecânicos em vários órgãos como baço, fígado, rim, pulmão e coração (Zhang et al., 2024). Dessa forma, a microbiota intestinal, que se desenvolve gradualmente ao longo dos primeiros mil dias de vida, é dinâmica e altamente suscetível aos fatores ambientais, que, por sua vez, podem levar ao desenvolvimento de doenças crônicas (Stinson, 2020).

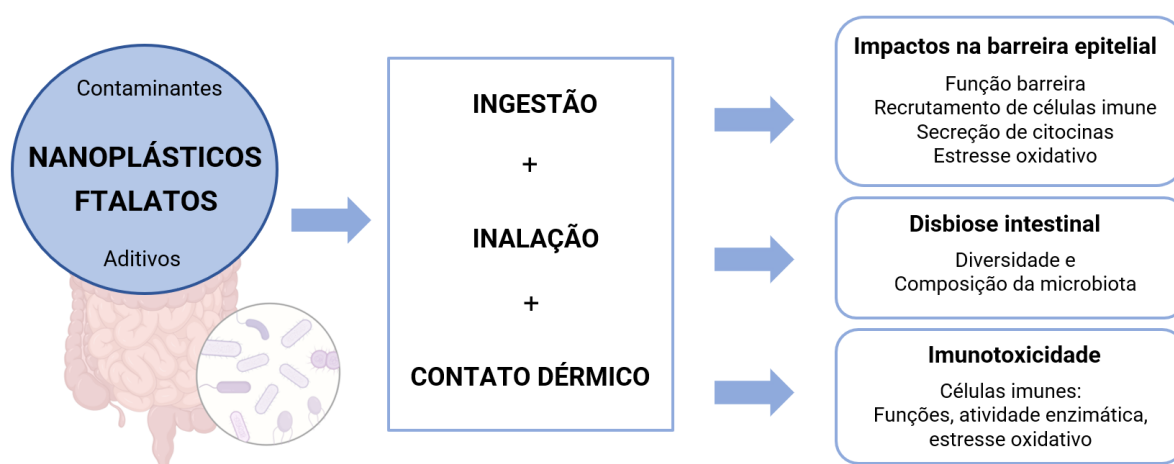


Figura 5: Representação esquemática da exposição aos nanoplásticos e ftalatos, as principais vias de exposição, e as consequências para o microambiente intestinal, como impactos na barreira epitelial, disbiose intestinal e imunotoxicidade. Fonte: adaptado de Hirt; Body-Malapel, 2020.

5 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

A gestação é um período crítico do desenvolvimento, caracterizado por maior sensibilidade e suscetível a diversos fatores ambientais, os quais podem interferir na programação fetal. Durante esse período, a placenta desempenha um papel fundamental na organogênese, na qual as interações multidirecionais entre o bebê, a placenta e a mãe definem o sucesso da reprodução. Assim como a microbiota intestinal desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase e na regulação imunológica materno-fetal, sua desregulação pode contribuir para

alterações na placenta e no desenvolvimento do feto. Nesse sentido, a hipótese DOHaD descreve que um ambiente hostil, como a exposição aos plásticos e seus aditivos, durante o desenvolvimento, pode aumentar o risco e a suscetibilidade de doenças mais tarde na vida. Além disso, estudos têm mostrado que a associação dos micro- e nanoplásticos com substâncias químicas dispersas no meio ambiente, incluindo os ftalatos, acentuam os efeitos dessas substâncias devido às suas interações com as partículas em diferentes organismos e seus efeitos no intestino (Deng et al., 2018; Zhang et al., 2020). Os ftalatos e nanoplásticos podem atravessar as membranas biológicas, barreiras hematoencefálica e placentária, além de interferir em diversos receptores hormonais e alterar a síntese e secreção de hormônios. No mais, pesquisas epidemiológicas em humanos revelaram que a exposição aos ftalatos, durante o desenvolvimento fetal, está associado ao baixo peso ao nascimento e a partos mais tardios, e seus metabólitos à diferenciação do trofoblasto, além de alterações na integridade do epitélio intestinal e na composição da microbiota, o que pode comprometer o desenvolvimento imunológico e metabólico do feto (Adibi et al., 2009; Zhang et al., 2009).

Sabendo que a dispersão do lixo plástico é um problema de saúde pública mundial, e que seus resíduos geram danos para a saúde de diferentes espécies, em especial na população de gestantes, estudar os impactos da exposição aos ftalatos e nanoplásticos é essencial para compreender melhor seus efeitos e adotar medidas que protejam a saúde gestacional, pós-natal e reprodutiva dos indivíduos. Assim, pretende-se investigar a exposição gestacional a uma mistura de ftalatos e nanoplásticos, em doses ambientalmente relevantes, com o intuito de testar a hipótese de que resíduos plásticos combinados, ou não, poderiam prejudicar a saúde materna, a placenta, o desenvolvimento do feto e a composição do microbioma materno. Com isso, pretende-se entender melhor os aspectos relacionados à interação materno-fetal em animais expostos a derivados plásticos, bem como, estimular a discussão de políticas públicas acerca da extensa e generalizada utilização do plástico e suas consequências.

6 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição gestacional a uma mistura de ftalatos e aos nanoplásticos de poliestireno (isolados e combinados) sobre a eficiência reprodutiva feminina, a morfologia placentária das ratas prenhes ao final da gestação, o desenvolvimento fetal de sua prole e a constituição do microbioma intestinal.

6.1 Objetivos específicos:

Ao comparar o grupo controle aos grupos expostos, os objetivos específicos foram:

Nas mães:

- Analisar parâmetros indicadores de fertilidade;
- Avaliar a composição da microbiota intestinal materna.

Nas placentas:

- Analisar a morfologia placentária, em nível histológico, no final do período gestacional (DG20);
- Analisar fatores de crescimento na placenta por RTq-PCR e Western Blotting;
- Avaliar outros alvos de diferenciação trofoblástica e síntese de glicocorticoides por RT-qPCR;
- Investigar biomarcadores de estresse oxidativo na placenta.

Na prole:

- Examinar medidas biométricas dos fetos ao final do período gestacional (DG20);
- Analisar parâmetros viscerais e esqueléticos fetais;
- Avaliar a composição da microbiota intestinal nos filhos pós-desmame (DPN22).

7 REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. T. Implantation and decidualization in rodents. **The Journal of experimental zoology**, v. 266, n. 6, p. 603–628, 1993.
- ADAK, A.; KHAN, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 76, n. 3, p. 473–493, 15 fev. 2019.
- ADIBI, J. J. et al. Maternal Urinary Metabolites of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate in Relation to the Timing of Labor in a US Multicenter Pregnancy Cohort Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, n. 8, p. 1015–1024, 15 abr. 2009.
- ARTONI, L. P. et al. Fator de crescimento fibroblástico básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 605–613, 2007.
- ARUMUGASAAMY, N. et al. Model Placental Barrier Phenotypic Response to Fluoxetine and Sertraline: A Comparative Study. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 18, 1 set. 2019.
- BANERJEE, A.; SHELVER, W. L. Micro- and Nanoplastic-Mediated Pathophysiological Changes in Rodents, Rabbits, and Chickens: A Review. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 9, p. 1480–1495, 1 set. 2021.
- BARBOZA, L. G. A.; VIEIRA, L. R.; GUILHERMINO, L. Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time. **Environmental pollution** (Barking, Essex: 1987), v. 236, p. 1014–1019, 1 maio 2018.
- BARKER, D. J. P. et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8663, p. 577–580, 9 set. 1989.
- BARKER, D. J. P.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8489, p. 1077–1081, 10 maio 1986.
- BARNES, D. K. A. et al. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 364, n. 1526, p. 1985–1998, 27 jul. 2009.
- BASAK, S.; VARMA, S.; DUTTARROY, A. K. Modulation of fetoplacental growth, development and reproductive function by endocrine disruptors. **Frontiers in endocrinology**, v. 14, 2023.
- BEVILACQUA, E. M.; ABRAHAMSOHN, P. A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. 1989.
- BRÄUNER, E. V. et al. Presence of parabens, phenols and phthalates in paired maternal serum, urine and amniotic fluid. **Environment international**, v. 158, 1 jan. 2022.
- BREHM, E.; FLAWS, J. A. Transgenerational Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Male and Female Reproduction. **Endocrinology**, v. 160, n. 6, p. 1421–1435, 1 jun. 2019.
- CALERO-MEDINA, L. et al. Dietary exposure to endocrine disruptors in gut microbiota: A systematic review. **The Science of the total environment**, v. 886, 15 ago. 2023.

- CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal origins of adult disease. **Current problems in pediatric and adolescent health care**, v. 41, n. 6, p. 158–176, 2011.
- CHA, J.; SUN, X.; DEY, S. K. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. **Nature medicine**, v. 18, n. 12, p. 1754–1767, dez. 2012.
- CHOUDHARY, D. et al. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 414, n. 1, p. 91–100, 1 jun. 2003.
- CIOBÂRCĂ, D. et al. Bariatric Surgery in Obesity: Effects on Gut Microbiota and Micronutrient Status. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2020.
- CORREA, I. P. et al. Expression of angiogenic factors in placenta of stressed rats. **Reproduction, fertility, and development**, v. 24, n. 6, p. 851–858, 2012.
- CORREIA-DA-SILVA, G. et al. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat pregnancy. **Placenta**, v. 25, n. 6, p. 538–547, 2004.
- DENG, Y. et al. Evidence that microplastics aggravate the toxicity of organophosphorus flame retardants in mice (*Mus musculus*). **Journal of hazardous materials**, v. 357, p. 348–354, 5 set. 2018.
- DENG, Y. et al. Microplastics release phthalate esters and cause aggravated adverse effects in the mouse gut. **Environment International**, v. 143, p. 105916, 1 out. 2020.
- FERGUSON, K. K. et al. Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation to sex hormones and puberty in boys. **Reproductive toxicology** (Elmsford, N.Y.), v. 47, p. 70–76, 2014.
- FISHER, M. et al. Concentrations of persistent organic pollutants in maternal and cord blood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study. **Environmental health: a global access science source**, v. 15, n. 1, 4 maio 2016.
- FOWDEN, A. L. et al. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. **The Journal of physiology**, v. 587, n. Pt 14, p. 3459–3472, 15 jul. 2009.
- FOWDEN, A. L. et al. Review: Endocrine regulation of placental phenotype. **Placenta**, v. 36 Suppl 1, n. S1, p. S50–S59, 1 abr. 2015a.
- GÁLVEZ-ONTIVEROS, Y. et al. Endocrine Disruptors in Food: Impact on Gut Microbiota and Metabolic Diseases. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1158, 1 abr. 2020.
- GARCÍA-MONTERO, C. et al. Nutritional Components in Western Diet Versus Mediterranean Diet at the Gut Microbiota-Immune System Interplay. Implications for Health and Disease. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 1–53, 1 fev. 2021.
- GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, 5 jul. 2017.
- GIGAULT, J. et al. Current opinion: What is a nanoplastic? **Environmental pollution** (Barking, Essex: 1987), v. 235, p. 1030–1034, 1 abr. 2018.
- GIGAULT, J. et al. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 2, p. 346–350, 14 abr. 2016.

GUARNOTTA, V. et al. Impact of Chemical Endocrine Disruptors and Hormone Modulators on the Endocrine System. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 10, 1 maio 2022.

GUTTMACHER, A. E.; MADDOX, Y. T.; SPONG, C. Y. The Human Placenta Project: Placental structure, development, and function in real time. **Placenta**, v. 35, n. 5, p. 303–304, 2014.

HEMBERGER, M.; HANNA, C. W.; DEAN, W. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. Nature reviews. **Genetics**, v. 21, n. 1, p. 27–43, 1 jan. 2020.

HERNANDEZ, L. M.; YOUSEFI, N.; TUFENKJI, N. Are there nanoplastics in your personal care products? **Environmental Science and Technology Letters**, v. 4, n. 7, p. 280–285, 1 jul. 2017.

HILLS, R. D. et al. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2019.

HIRKE, A. et al. Exposure to endocrine-disrupting chemicals and risk of gestational hypertension and preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. **Environmental pollution** (Barking, Essex: 1987), v. 317, 15 jan. 2023.

HIRT, N.; BODY-MALAPEL, M. Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature. **Particle and fibre toxicology**, v. 17, n. 1, 1 dez. 2020.

JAIN, N. The early life education of the immune system: Moms, microbes and (missed) opportunities. **Gut Microbes**, v. 12, n. 1, 9 nov. 2020.

JAWERBAUM, A.; CAPOBIANCO, E. Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: implications in maternal diabetes. **Placenta**, v. 32 Suppl 2, n. SUPPL. 2, mar. 2011.

JIN, Y. et al. Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. **Science of The Total Environment**, v. 649, p. 308–317, 1 fev. 2019.

KANNAN, K.; VIMALKUMAR, K. A Review of Human Exposure to Microplastics and Insights Into Microplastics as Obesogens. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, 18 ago. 2021.

KRISS, M. et al. Low Diversity Gut Microbiota Dysbiosis: Drivers, Functional Implications and Recovery. **Current opinion in microbiology**, v. 44, p. 34, 1 ago. 2018.

KUWAHARA, A. et al. Microbiota-gut-brain axis: enteroendocrine cells and the enteric nervous system form an interface between the microbiota and the central nervous system. **Biomedical research (Tokyo, Japan)**, v. 41, n. 5, p. 199–216, 2020.

LANDRIGAN, P. J. et al. Human Health and Ocean Pollution. **Annals of global health**, v. 86, n. 1, p. 1–64, 2020.

LEI, M. et al. Environmental Chemical Diethylhexyl Phthalate Alters Intestinal Microbiota Community Structure and Metabolite Profile in Mice. **mSystems**, v. 4, n. 6, 2019.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and clinical endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122–134, 1994.

LESO, V. et al. The endocrine disrupting effects of nanoplastic exposure: A systematic review. **Toxicology and industrial health**, v. 39, n. 11, p. 613–629, 1 nov. 2023.

- LIU, B. et al. Influence of maternal endocrine disrupting chemicals exposure on adverse pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 270, 15 jan. 2024.
- MALAISSÉ, Y. et al. Gut dysbiosis and impairment of immune system homeostasis in perinatally-exposed mice to Bisphenol A precede obese phenotype development. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- MARIAT, D. et al. The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 9 jun. 2009.
- MARSIT, C. J. Placental Epigenetics in Children's Environmental Health. **Seminars in reproductive medicine**, v. 34, n. 1, p. 36–41, 22 dez. 2016.
- MEDLEY, E. A. et al. A Systematic Review of the Placental Translocation of Micro- and Nanoplastics. **Current environmental health reports**, v. 10, n. 2, p. 99–111, 1 jun. 2023.
- MEEKER, J. D.; FERGUSON, K. K. Urinary phthalate metabolites are associated with decreased serum testosterone in men, women, and children from NHANES 2011-2012. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 99, n. 11, p. 4346–4352, 1 nov. 2014.
- MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut microbes**, v. 7, n. 3, p. 189–200, 3 maio 2016.
- MURPHY, V. E. et al. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. **Endocrine reviews**, v. 27, n. 2, p. 141–169, abr. 2006.
- NABI, G. et al. The adverse health effects of increasing microplastic pollution on aquatic mammals. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, n. 4, p. 102006, 1 jun. 2022.
- ÖZEL, F.; RÜEGG, J. Exposure to endocrine-disrupting chemicals and implications for neurodevelopment. **Developmental medicine and child neurology**, v. 65, n. 8, p. 1005–1011, 1 ago. 2023.
- PAN, J. et al. The adverse role of endocrine disrupting chemicals in the reproductive system. **Frontiers in endocrinology**, v. 14, 2024.
- PARK, E. J. et al. Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible implications on reproduction and development of the next generation. **Toxicology letters**, v. 324, p. 75–85, 15 maio 2020.
- PLASTICS EUROPE. Plastics – the fast Facts 2023 • Plastics Europe. Disponível em: <<https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>>. Acesso em: 4 set. 2024.
- PRATA, J. C. et al. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. **The Science of the total environment**, v. 702, 1 fev. 2020.
- RADKE, E. G. et al. Phthalate exposure and male reproductive outcomes: A systematic review of the human epidemiological evidence. **Environment international**, v. 121, n. Pt 1, p. 764–793, 1 dez. 2018.
- RAGUSA, A. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. **Environment international**, v. 146, 1 jan. 2021.

- ROSEBOOM, T. J.; WATSON, E. D. The next generation of disease risk: are the effects of prenatal nutrition transmitted across generations? Evidence from animal and human studies. **Placenta**, v. 33 Suppl 2, n. SUPPL. 2, nov. 2012.
- ROSSANT, J.; CROSS, J. C. Placental development: lessons from mouse mutants. **Nature reviews. Genetics**, v. 2, n. 7, p. 538–548, jul. 2001.
- SANDOVICI, I. et al. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. **Reproductive biomedicine online**, v. 25, n. 1, p. 68–89, jul. 2012.
- SARKAR, A. et al. The Association between Early-Life Gut Microbiota and Long-Term Health and Diseases. **Journal of clinical medicine**, v. 10, n. 3, p. 1–24, 1 fev. 2021.
- SERMAN, A.; SERMAN, L. Development of placenta in a rodent--model for human placentation. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 3, n. 1, p. 233–239, 1 jan. 2011.
- SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. Csf2 null mutation alters placental gene expression and trophoblast glycogen cell and giant cell abundance in mice. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 1, p. 207–221, jul. 2009.
- SILVA, J. F.; SERAKIDES, R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. **Cell adhesion & migration**, v. 10, n. 1–2, p. 88–110, 3 mar. 2016.
- SKOGEN, J. C.; ØVERLAND, S. The fetal origins of adult disease: a narrative review of the epidemiological literature. **JRSM short reports**, v. 3, n. 8, p. 1–7, ago. 2012.
- SONG, Y. K. et al. Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion on Microplastic Fragmentation by Polymer Type. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 8, p. 4368–4376, 18 abr. 2017.
- STINSON, L. F. Establishment of the early-life microbiome: a DOHaD perspective. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 11, n. 3, p. 201–210, 1 jun. 2020.
- SWAN, S. H. et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 8, p. 1056–1061, ago. 2005.
- TACHIBANA, M.; NAKAYAMA, M.; MIYOSHI, Y. Placental examination: prognosis after delivery of the growth-restricted fetus. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, v. 28, n. 2, p. 95–100, 1 abr. 2016.
- TAKATA, K. et al. Ultrastructure of the Rodent Placental Labyrinth: A Site of Barrier and Transport. **Journal of Reproduction and Development**. [s.l.: s.n.].
- TETRO, N. et al. The Placental Barrier: the Gate and the Fate in Drug Distribution. **Pharmaceutical research**, v. 35, n. 4, 1 abr. 2018.
- THOMAS ZOELLER, R. et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4097–4110, 1 set. 2012.
- TURCO, M. Y.; MOFFETT, A. Development of the human placenta. **Development (Cambridge, England)**, v. 146, n. 22, 15 nov. 2019.

- ULLAH, S. et al. A review of the endocrine disrupting effects of micro and nano plastic and their associated chemicals in mammals. **Frontiers in endocrinology**, v. 13, 16 jan. 2023.
- VALDES, A. M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 361, p. 36–44, 2018.
- VIJAY, A.; VALDES, A. M. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. **European journal of clinical nutrition**, v. 76, n. 4, p. 489–501, 1 abr. 2022.
- WAGNER, S.; REEMTSMA, T. Things we know and don't know about nanoplastic in the environment. **Nature nanotechnology**, v. 14, n. 4, p. 300–301, 1 abr. 2019.
- WANG, Y.; ZHU, H.; KANNAN, K. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. **Toxics**, v. 7, n. 2, p. 21, 2019.
- WATKINS, D. J. et al. In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in relation to female sexual maturation. **Environmental research**, v. 134, p. 233–241, 2014.
- WATSON, E. D.; CROSS, J. C. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. **Physiology**, jun. 2005.
- YILMAZ, B. et al. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 21, n. 1, p. 127–147, 1 mar. 2020.
- YOON, K. et al. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases. Journal of toxicology and environmental health. Part B, **Critical reviews**, v. 17, n. 3, p. 127–174, 3 abr. 2014.
- ZHANG, X.; HO, S. M. Epigenetics meets endocrinology. **Journal of molecular endocrinology**, v. 46, n. 1, p. R11, fev. 2011.
- ZHANG, Y. et al. Exposure to microplastics cause gut damage, locomotor dysfunction, epigenetic silencing, and aggravate cadmium (Cd) toxicity in Drosophila. **The Science of the total environment**, v. 744, 20 nov. 2020.
- ZHANG, Y. et al. Phthalate Levels and Low Birth Weight: A Nested Case-Control Study of Chinese Newborns. **The Journal of Pediatrics**, v. 155, n. 4, p. 500–504, 1 out. 2009.
- ZHANG, Z. et al. Polystyrene microplastics induce size-dependent multi-organ damage in mice: Insights into gut microbiota and fecal metabolites. **Journal of hazardous materials**, v. 461, 5 jan. 2024.
- ZHOU, C.; GAO, L.; FLAWS, J. A. Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 318, p. 49–57, 1 mar. 2017.

CAPÍTULO 2: ALTERAÇÕES MATERNAS E PLACENTÁRIAS

Efeitos da exposição materna a uma combinação de ftalatos e nanoplásticos na morfofisiologia placentária e no perfil oxidativo

Natália Magosso¹, Patrick Vieira de Souza¹, Mirella Franco Moreira¹, Vanessa Aguiar Rocha¹, Matheus Naia Fioretto¹; Victória Cristina Pinha¹, Gabriel Aquino de Souza Maia¹, Vinícius Luís Rocha da Silva Maria², Wellerson Rodrigo Scarano¹

¹ Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, São Paulo, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, UNESP, Bauru, SP, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

O conceito DOHaD propõe que insultos ambientais e efeitos adversos durante períodos críticos do desenvolvimento podem impactar a saúde e a biologia do desenvolvimento da prole ao longo da vida (Lapehn; Paquette, 2022; Alves; Alves, 2024), aumentando a suscetibilidade a doenças crônicas como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. Dentre os fatores ambientais, a exposição aos ftalatos e nanoplásticos constitui um fator extremamente preocupante, visto que esses compostos são onipresentes no ambiente capazes de atravessar barreiras biológicas, como a hematoencefálica, a placentária e a hematotesticular (Zurub et al., 2024), podendo gerar danos na morfogênese, na função placentária e na programação epigenética (Chavatte-Palmer; Couturier-Tarrade; Rousseau-Ralliard, 2024). Em vista disso, é importante destacar que apesar do plástico trazer grandes conveniências aos humanos, nos últimos anos, a produção de plástico vem crescendo exacerbadamente, e expondo os seres humanos e todo o ecossistema à poluição plástica. Em virtude dessa contaminação tão difundida e do crescimento da cultura “descartável”, surge o termo atual “era do plasticeno”, usado para descrever essa nova era dominada pelo plástico (Renault et al., 2024).

A literatura tem demonstrado que a exposição materna aos ftalatos provoca danos no desenvolvimento do sistema genital, como o aumento de incidência de câncer de próstata

(Scarano et al., 2019; Aquino et al., 2023), redução da DAG e atraso da puberdade em modelos *in vivo* (Radke et al., 2018); impactos no sistema respiratório (Vernet et al., 2017); e nas funções tireoidianas (Alsen et al., 2021). Além disso, um estudo mostrou uma associação significativa entre a exposição aos ftalatos e efeitos adversos em homens e mulheres, como diabetes tipo II, resistência à insulina, sobrepeso/obesidade, alergia e asma (Wang; Zhu; Kannan, 2019).

Os nanoplásticos foram descritos como causadores de adversos efeitos sistêmicos tanto em humanos quanto em roedores. Efeitos como inflamação e estresse oxidativo nos ovários e testículos (Wei et al., 2022), aumento de processos celulares inflamatórios (Forte et al., 2016; Banerjee; Shelver, 2021), inflamação no fígado (Deng et al., 2017), estresse oxidativo e apoptose (Inkielewicz-Stepniak et al., 2018), efeitos na homeostase metabólica, como alterações no metabolismo de aminoácidos, disbiose intestinal e disfunção da barreira intestinal (Jin et al., 2019; Luo et al., 2019).

Além dos efeitos sobre a prole, é fundamental considerar os impactos sobre as mães, representando um "ponto de partida" crucial para compreender as consequências biológicas e transgeracionais. Em vista disso, um estudo de coorte demonstrou que a exposição aos ftalatos pode prejudicar a saúde e a pressão arterial materna, ao relatar a associação positiva entre a exposição pré-natal aos ftalatos e a hipertensão induzida pela gravidez (Soomro et al., 2023). Adicionalmente, os ftalatos podem afetar o metabolismo da glicose ao inibir a sinalização da insulina, a captação ou a oxidação da glicose no organismo (Radke et al., 2020). Em relação aos NPs, um estudo experimental demonstrou que a exposição materna ao poliestireno de nanoplástico (NPs) de 50 nm de diâmetro (0,5 a 100ug/dia) leva a distúrbios neurológicos nas mães e na prole (Jeong et al., 2022). Outro estudo elucidou que a exposição materna aos NPs de 100 nm, a uma única dose de 50ug/dia, durante a gestação e lactação, impactam o eixo microbiota-intestino-cérebro, destacando o risco de disfunção cerebral em descendentes e também sobre as mães (Li et al., 2024).

Portanto, investigar quais são as consequências diretas do impacto da exposição materna aos ftalatos e nanoplásticos, enfatizando a saúde materna e placentária, pode trazer resultados biológicos valiosos para compreender as consequências sobre o desenvolvimento não só da prole, como também das mães. Dessa forma, hipotetizamos que a exposição aos nanoplásticos e ftalatos, isolados ou em combinação, afeta negativamente a eficiência reprodutiva feminina e a morfofisiologia placentária, resultando em alterações fenotípicas e moleculares que podem estar associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas na prole.

2. OBJETIVO

A fim de fornecer uma compreensão aprofundada dos impactos bioquímicos e estruturais da exposição a esses poluentes ambientais na placenta, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição gestacional a uma mistura de ftalatos e aos nanoplásticos de poliestireno (isolados e combinados) sobre a eficiência reprodutiva feminina e a morfologia placentária das ratas prenhes ao final da gestação (DG20). Para isso, foram analisados parâmetros indicadores de fertilidade da fêmea; a morfologia placentária; fatores de crescimento na placenta por RTq-PCR e Western Blotting; e biomarcadores de estresse oxidativo na placenta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

Machos adultos da linhagem Sprague Dawley (n=15), com 120 dias de idade (DPN), pesando aproximadamente 300g e fêmeas adultas (n=50), no DPN120, pesando aproximadamente 300g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do IBB/UNESP, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23-25°C) e receberam água (em garrafas de vidro) e ração para roedores à vontade. Após o período de aclimação dos animais, eles foram separados para o acasalamento, que foi realizado durante o período escuro do ciclo, colocando-se de duas fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhez (DG0) foi determinado pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro.

As ratas prenhes foram divididas aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=6-8/grupo): CTR: grupo controle que recebeu o óleo de milho/água; T1: recebeu 20 µg/kg/dia da mistura de ftalatos (MF) diluídos em óleo de milho; T2: recebeu 200 mg/kg/dia da mistura de ftalatos (MF) diluídos em óleo de milho; T3: recebeu nanoesferas de poliestireno (NPs) de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg/dia diluído em água destilada; T4: recebeu 20µg/kg/dia da MF + NPs de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg; e T5: recebeu 200mg/kg/dia da MF+ NPs de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg. As ratas de cada grupo receberam o tratamento, via oral, do dia gestacional 5 (DG5) ao DG20.

Os animais dos grupos T1, T2, T4 e T5 receberam as respectivas doses da mistura de ftalatos na seguinte proporção: 21% DEHP (di-2-etilhexil ftalato), 35% DEP (dietil ftalato), 15% DBP (di-n-butil ftalato), 8% DiBP (diisobutil ftalato), 5% BBzP (butil benzil ftalato), e

15% DiNP (diisononil ftalato). A proporção da mistura se baseia na composição dos principais ftalatos detectados em amostras de urina de mulheres grávidas em Illinois, EUA (Zhou; Gao; Flaws, 2017). Os ftalatos e nanoplástico foram obtidos da Sigma Aldrich ®: DEHP: 36735, DEP: 524972, DBP: 524980, DiBP: 152641, BBzP: 308501, DiNP: 376663; nanoesferas de poliestireno (nanoplásticos): 43302.

Durante o tratamento, as ratas prenhes, mantidas em gaiolas individuais, foram pesadas em dias alternados para calcular o volume da mistura e dos NPs a ser administrado. Foram investigados sinais clínicos de toxicidade (peso corporal, diarreia, piloereção, sangramento, respiração anormal, tremores, convulsões e mudança de marcha, postura e reação à manipulação). No DG20, 6-8 ratas por grupo foram anestesiadas com uma mistura de xilazina (5mg/kg corpóreo) e cetamina (80mg/kg corpóreo) para laparotomia, e em seguida, foi realizada punção cardíaca para coleta do sangue. Os fetos e as suas respectivas placentas foram isolados e pesados. As placentas foram fragmentadas para o estudo histológico e molecular. O delineamento experimental está representado na figura 5. Imagem criado pelo app BioRender.com (Figura 5).

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (ANEXO 2) (Protocolo: 1174020523).

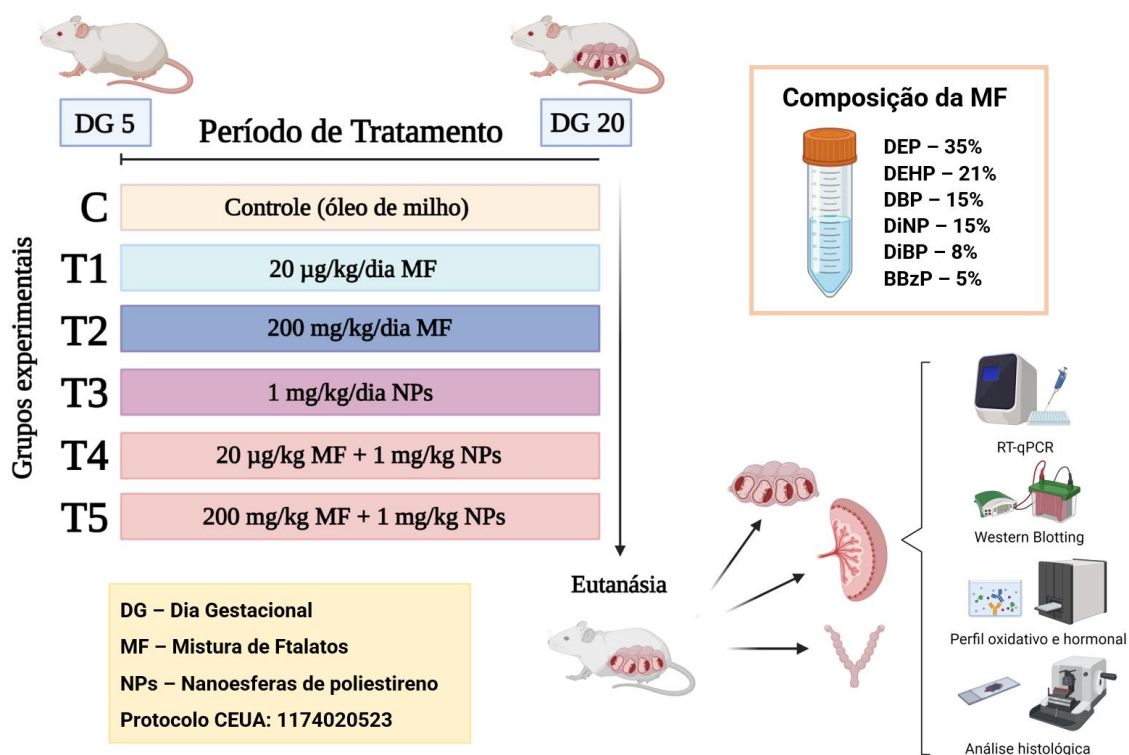


Figura 6: Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas e a composição da mistura de ftalatos (MF). O tratamento foi do dia gestacional 5 (DG5) até o DG20, por via oral. As ratas prenhes foram divididas em 6 grupos experimentais, grupo controle (C): recebeu óleo de milho/água (veículo), T1: recebeu 20µg/kg/dia da MF, T2: recebeu 200mg/kg/dia da MF, T3: recebeu 1mg/kg/dia de nanoesferas de poliestireno (NPs) 100 nm, T4: recebeu 20µg/kg/dia + 1mg/kg/dia de NPs, e T5: recebeu 200mg/kg/dia + 1mg/kg/dia de NPs. Ao final do período gestacional (DG20), as ratas foram eutanasiadas e os fetos, placentas, ovários e útero coletados para análises biométricas, histológicas e moleculares.

3.2 Justificativa das doses

O nível de exposição diária estimada da população geral de DEHP, um dos ftalatos mais amplamente utilizado, é de 3-30 µg/kg/dia (Doull et al., 1999). Em relação aos outros ftalatos da mistura, a faixa de exposição humana diária do DEP é de 2,32 a 12 µg/kg/dia, do BzBP é de 0,26 a 0,88 µg/kg/dia, do DBP é de 0,84 a 5,22 µg/kg/dia e do DiBP é de 0,12 a 1,4 µg/kg/dia, já o DiNP chegam a 26 µg/kg/dia (Doull et al., 1999; Kavlock et al., 2002). De acordo com essa estimativa, a dose inferior da mistura de ftalatos utilizada no nosso estudo (20 µg/kg/dia) imita a exposição humana diária pois contém aproximadamente 4 µg/kg/dia de DEHP, a dose de ingestão diária tolerável (EPA, 1996). A dose mais elevada (200 mg/kg/dia) contém aproximadamente 100 mg/kg/dia de DEHP, e foi escolhida para testar os efeitos desta mistura a um nível superior ao da exposição humana ambiental; com o intuito de comparar os nossos resultados com informações disponíveis de estudos com um único ftalato que utilizaram doses próximas deste nível, e com estudos isolados de exposição ocupacional (Zhou; Gao; Flaws,

2017; Scarano et al., 2019; De Freitas et al., 2021).

A dose de nanoesferas de poliestireno (NPs – 100 nm) selecionada foi a de 1 mg/kg de peso corporal/dia para avaliar a concentração ambientalmente relevante de nanoplásticos. Recentemente, há diversos estudos nos quais avaliam os efeitos e a toxicidade da exposição de micro e/ou nanoplásticos em diferentes concentrações e tamanhos (Yong; Valiyaveettil; Tang, 2020). Em estudos com camundongos expostos, durante a gestação ou não, a partículas de poliestireno (0,5, 50 e 100 nm), com dose de 1mg/L, foram observados efeitos como diminuição do peso corporal, alteração da microbiota intestinal, e aumento de estresse oxidativo, e em casos de exposição materna, pode aumentar o risco de distúrbios metabólicos na prole (Deng et al., 2017; Lu et al., 2018; Luo et al., 2019). Já em humanos, dados de toxicidade são mais escassos. Outro estudo com MNPs de 20, 500 ou 1000 nm mostrou que as partículas são facilmente absorvidas por células sanguíneas e potencialmente citotóxicas, além de estimularem a secreção de interleucinas pró-inflamatórias (Priehl et al., 2014).

3.3 Avaliações maternas e Teste de fertilidade

As fêmeas prenhes foram anestesiadas e eutanasiadas no DG20. Foram coletados os ovários para o registro do número de corpos lúteos e o útero para observação dos sítios de implantação, reabsorções, número de fetos vivos e mortos. Ainda, os fetos e suas respectivas placentas foram pesados. Com esses dados coletados, foi feita a determinação do potencial de fertilidade (eficiência de implantação): sítios de implantação/ corpos lúteos x 100; taxa de perdas pré-implantação: nº de corpos lúteos – nº de implantações/ nº de corpos lúteos X 100; taxa de perdas pós-implantação: nº de implantações – nº de fetos vivos/ nº de implantações x 100; e eficiência placentária, que é a relação dos pesos fetal e placentário.

As placentas coletadas foram aquelas que se encontravam na extremidade distal dos cornos uterinos e, após identificação do sexo, duas de fêmeas e duas de machos, foram selecionadas, seccionadas sagitalmente e fixadas em solução Davidson (30% de álcool absoluto, 15% de formaldeído, 5% de ácido acético e 50 % de água destilada) antes de ser processado para a incorporação em parafina, e outra placenta (prole masculina) foi congelada a -80°C para análises moleculares e de estresse oxidativo.

3.4 Microscopia de luz e morfometria placentária

Amostras das placentas, seccionadas sagitalmente, foram fixadas por imersão em Solução Davidson por 24 horas, a 4°C, em seguidas transferidas para álcool 70% para serem incluídas

em Paraplast® (Sigma-Aldrich®). Cortes semi-seriados de 5µm, com intervalo entre os cortes de 50 µm, foram produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso. Após microtomia, os cortes do material incluído em Paraplast® foram submetidos a seguinte coloração:

- Hematoxilina-Eosina (HE): para estudo morfológico de ordem geral;

Os campos microscópicos foram digitalizados utilizando o sistema de captura e análise de imagens acoplado a fotomicroscópio AxioLab. A1 (Carl Zeiss Microscope, Jena, Germany). As lâminas coradas pelo HE foram fotografadas e a espessura (comprimento) das regiões da zona do labirinto (ZL), zona basal (ZB) e da decídua basal (Dec) foram mensuradas pelo software ImageJ, usando cortes com as áreas máximas para a camada de toda a placenta. Os valores médios do comprimento foram calculados a partir de 3 cortes seriados de pelo menos 2 placentas femininas e 2 placentas masculinas de cada ninhada.

3.5 Análise molecular por RT-qPCR

Após a eutanásia, amostras de placentas coletadas foram mantidas a -80°C até o momento do uso. A extração do RNA (n = 5 animais/grupo) foi realizada com o kit TriZol (Ambion, EUA), segundo as instruções do fabricante. A quantificação e a pureza do material foram verificadas por espectrofotometria em um NanoVue™ Plus (GE HealthCare Life Sciences, Estados Unidos). A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, EUA). Os primers foram desenhados através do software Primer Express® (AppliedBiosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de sequências publicadas no GenBank (www.pubmed.com), e sintetizados pela Exxtend Biotecnologia – Solução em Oligos (Paulínia, SP, Brasil). A termociclagem foi executada no equipamento QuantStudio (Life Technologies, EUA). As reações para cada gene foram elaboradas em duplicatas, e para cada amostra foi plotado um gráfico de amplificação. A quantificação relativa de cada gene foi realizada utilizando o método 2-ΔΔ CT, de acordo com Livak e Schmittgen, (2001). Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre os genes alvo e o gene endógeno (*Gapdh*). Os alvos de interesse foram genes cuja expressão gênica está relacionado a sinalização celular em células trofoblásticas (*Ppara* e *Pparγ*), fatores de crescimento (*Vegf*, *Fgf*, *Plgf*, *Igf-1*), e vias de biossíntese de glicocorticoides (*Cyp11b1* e *Hsd11b2*). A lista de primers obtidos está no anexo 1 (ANEXO 1 - Tabela 4).

3.6 Análise da expressão proteica por Western Blotting

As placentas (n=5/grupo) foram homogeneizadas em tampão de extração RIPA (Pierce, Rockford, IL, USA) adicionado de inibidor de proteases. Posteriormente foram centrifugadas a 4000 RPM, a 4°C por 20 minutos para remoção do material insolúvel. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de (Bradford, 1976). Alíquotas (70µg de proteínas) foram submetidas à eletroforese, sob condições redutoras, em gel de poliacrilamida a 10%. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). Após isso, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% diluído em TBS por 1h e então incubadas por 16 horas a 4° C com os anticorpos primários, que foram selecionados dentre os alvos encontrados alterados no RT-qPCR.

Após a lavagem em TBS, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico para cada primário por 2 horas e novamente lavadas em TBS. O peso molecular relativo das bandas foi determinado de acordo com o padrão de peso molecular marcado com cores, Kaleidoscope (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), que foi adicionado junto à corrida eletroforética. A reação foi revelada por kit ECL e as imagens das bandas foram adquiridas em equipamento fotodocumentador Image Quant 350 (GE – Healthcare). Posteriormente, foram realizadas análises semiquantitativas por densitometria das bandas, e as densidades ópticas integradas (IODs) das bandas de proteínas alvo foram medidas usando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA). Os níveis de expressão foram normalizados (divididos pelos valores de quantificação) para β -actina (Abclonal, AC026, lot.9100026001) (peso molecular 42 kDa – endógeno – que também foi revelado da mesma forma que os alvos) e os resultados normalizados foram expressos como a média $\pm$ DP. Os anticorpos escolhidos para a análise foram VEGF (Santa Cruz, SC152, lot. D0815) e IGF-1 (Santa Cruz, SC1422, lot.J1810).

3.7 Avaliação do perfil oxidativo nas placentas

As técnicas aqui foram realizadas na Universidade Estadual de Londrina (UEL) em parceria com a profa. Dra. Glaucia S. A. Fernandes. Os fragmentos armazenados em freezer a -80°C e enviados para Londrina foram homogeneizados com um homogeneizador Ultraturrax (Marconi, Piracicaba, Brasil) em tampão fosfato-salina (pH 7.2) e normalizados a 1 mg de proteínas/mL de acordo com o método de Bradford (Bradford, 1976). Deste homogenato, determinou-se a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), proteínas carbonílicas (PCO), glutathiona reduzida (GSH), glutathionas totais (GT), glutathiona S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

3.7.1 Lipoperoxidação

A concentração de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi utilizada para quantificar a peroxidação lipídica, de acordo com o método descrito por Federici (2007) (Federici; Shaw; Handy, 2007). Os níveis de TBARS foram determinados pela diferença das absorbâncias em 535 e 572 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Os resultados foram expressos em nanomols de TBARS/mg de proteína.

3.7.2 Proteínas carbonílicas

Para a quantificação de proteínas carboniladas utilizou-se o método de Reznick e Parker (1994) com adaptações (Reznick; Packer, 1994). Para tal, utilizou-se de homogenatos proteicos normalizados a 1mg/mL. Foram adicionados 300uL de amostra homogeneizada em dois tubos, o branco, no qual foram adicionados 500uL de HCl 2M, e a reação, ao qual foram adicionados meio de reação contendo 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB; 0,1982%) diluído em HCl 2M. As reações foram incubadas por 1h com agitação vigorosa a cada 15 min. Após esse tempo, adicionou-se 500uL de ácido tricloroacético (TCA; 28%) em todos os tubos e aguardou-se 10 minutos para formação de precipitado. Em seguida, todos os tubos foram centrifugados a 9.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi ressuspensionado com 1 mL de solução de etanol e acetato de etila (1:1), em seguida os tubos foram centrifugados e tiveram seu sobrenadante descartado. Esse processo de lavagem do pellet foi repetido por mais 2 vezes. Então, adicionou-se 350 mL de solução aquosa de hidrocloreto de guanidina (57,31%) nos tubos, que foram agitados e a reação foi incubada por 10 minutos. Por fim, pipetou-se 150uL da solução final em microplaca e a absorbância foi medida em 380 nm.

3.7.3 Glutationas

As concentrações de GSH e GT foram realizadas de acordo com o proposto por Rahman e colaboradores (2007) (Rahman; Kode; Biswas, 2007). O método baseia-se na reação entre o ácido 5,5-ditiobis 20-nitrobenzóico (DTNB) e a GSH, resultando em um produto de coloração amarelada, cuja absorbância é medida em 412 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

Para a GT, o método baseia-se na redução da glutathiona oxidada (GSSG) na amostra pela adição de NADPH, numa reação catalizada pela glutathiona redutase (GR), que também é acrescida ao meio. Posteriormente, a glutathiona total, agora reduzida, é quantificada também por reação com DTNB com absorbância medida em 412 nm. Os resultados foram expressos em

μmol/mg de proteína.

A concentração de (GSSG) foi calculada de acordo com o proposto por Carrara e colaboradores (2019), (Carrara, 2019) levando em consideração a estequiometria da reação. Os valores de GSSG foram calculados seguindo a equação:

$$GSSG (\mu\text{mol}) = [GT] - [GSH]/2$$

Os resultados foram expressos em μmol/mg de proteína.

A atividade da enzima GST foi avaliada conforme proposto por Keen e colaboradores (1976) (Keen; Habig; Jakoby, 1976). Espectrofotometricamente por meio da redução de GSH e lise de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), com formação tioésteres. A absorbância da reação foi medida a 340 nm durante 5 min em intervalos de 40 s. Os resultados foram expressos como μM de tioéter formados por minuto por mg de proteína.

3.7.4 Atividade da catalase

A atividade da CAT foi determinada por meio da degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A absorbância da reação foi medida em 240 nm por 1 min, em intervalos de 15 s. Os resultados foram expressos em mM/minuto/mg de proteína.

3.7.5 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da enzima SOD foi determinada de acordo com o proposto por Senthikulmar com adaptações de Erthal e colaboradores (2020) (Erthal et al., 2020). O método baseia-se na quantificação de complexos formados pelos ânions superóxido com o nitroblue tetrazolium (NBT) e com o hidrocloreto de sódio de hidroxilamina (NH₂OH.HCl), de coloração azulada, cuja absorbância foi medida em 560 nm por 2 min em intervalos de 15 s. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg de proteína.

3.8 Análise estatística

Nas análises estatísticas, a unidade experimental foi a ninhada. Os valores obtidos foram expressos como média ± DP ou mediana, seguido do intervalo interquartil q1-q3. Para os dados quantitativos e morfométricos foi utilizado o ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. A diferença estatística foi considerada significativa quando *p<0,05, ou **p<0,01. Para essas análises foi utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros maternos e placentários

Durante o período de tratamento, não foram observados sinais de toxicidade clínica nas ratas prenhes expostas aos ftalatos e nanoplásticos. Não houve diferença no ganho de peso corpóreo, potencial de fertilidade e peso do útero gravídico entre os grupos experimentais bem como em outros parâmetros reprodutivos como números de corpos lúteo, números de absorções e implantações, taxa de perda pós-implantacional (Tabela 1). No entanto, foi observado um aumento na taxa de perda pré-implantacional nos grupos T3, T4 e T5 em relação ao controle (CTR) (Tabela 1).

Parâmetros	Grupos experimentais					
	CTR	T1	T2	T3	T4	T5
Peso Corpóreo Final (g) (DG20)	402,1 ± 33,39	384,4 ± 26,35	397,7 ± 13,69	397,4 ± 58,83	417,0 ± 45,87	391,1 ± 63,33
Ganho de peso Corpóreo (g)	102,9 ± 13,8	93,14 ± 22,7	104,7 ± 12,18	86,14 ± 32,58	94,2 ± 33,37	93,71 ± 36,9
Peso do útero gravídico (g)	70,81 ± 12,96	69,15 ± 13,88	81,31 ± 8,38	66,05 ± 24,94	77,92 ± 16,23	70,35 ± 31,95
Potencial de Fertilidade (%)	88,41 ± 3,47	85,67 ± 12,42	91,25 ± 7,99	67,70 ± 24,34	73,65 ± 26,04	75,64 ± 34,43
Nº implantações	12,83 ± 2,14	12,00 ± 1,91	13,83 ± 1,33	10,86 ± 4,06	12,00 ± 5,24	12,29 ± 6,26
Nº Corpos Lúteos	14,5 ± 2,17	14,00 ± 0,82	15,17 ± 0,75	16,14 ± 3,76	16,00 ± 4,12	16,00 ± 2,31
Nº reabsorções	1,00 ± 1,00	0,57 ± 0,78	0,50 ± 0,83	1,14 ± 1,46	1,00 ± 1,00	0,29 ± 0,49
Taxa de perda pré-implantacional (%)	11,49 ± 1,42	14,28 ± 4,69	8,79 ± 3,26	32,74 ± 8,72 **	25,00 ± 11,65 *	23,21 ± 13,01 *
Taxa de perda pós-implantacional (%)	8,33 ± 2,99	4,54 ± 2,65	3,48 ± 2,22	9,52 ± 5,43	7,69 ± 3,89	2,27 ± 4,69

Tabela 1: Parâmetros reprodutivos e de pesos maternos. Valores expressos média ± DP (n = 7/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando p<0,05 comparado ao CTR. Para as taxas de perdas foi feito teste de Fisher; e significativo quando *p<0,05 ou **p<0,01 comparado ao CTR.

Em relação aos parâmetros placentários, o peso placentário da prole masculina reduziu no grupo T3 em relação ao CTR, consequentemente, a relação do peso fetal sobre placentário, conhecido como eficiência placentária, aumentou nesse mesmo grupo (Tabela 2).

Parâmetros	Grupos experimentais					
	CTR	T1	T2	T3	T4	T5
Peso Placentário (Fêmeas) (g)	0,66 ± 0,03	0,63 ± 0,08	0,62 ± 0,04	0,67 ± 0,15	0,59 ± 0,06	0,68 ± 0,12
Peso Placentário (Machos) (g)	0,65 ± 0,11	0,63 ± 0,07	0,65 ± 0,06	0,56 ± 0,12*	0,61 ± 0,08	0,66 ± 0,09
Eficiência Placentária (Fêmeas)	6,56 ± 0,82	6,44 ± 0,65	6,67 ± 0,41	6,01 ± 1,61	6,79 ± 0,36	6,25 ± 1,35
Eficiência Placentária (Machos)	6,51 ± 0,51	6,73 ± 0,43	6,78 ± 0,83	7,34 ± 1,60*	6,82 ± 0,78	6,45 ± 1,43

Tabela 2: Parâmetros placentários por ninhada. Valores expressos média ± DP; teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando *p<0,05 comparado ao CTR.

4.2 Análise histológica e morfometria placentária

Na análise histológica pode se observar a presença de todos os componentes teciduais das placentas nos diferentes grupos (Figura 7). Na análise morfométrica da placenta, através da medida de comprimento e área do eixo placentário, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos (Figura 8).

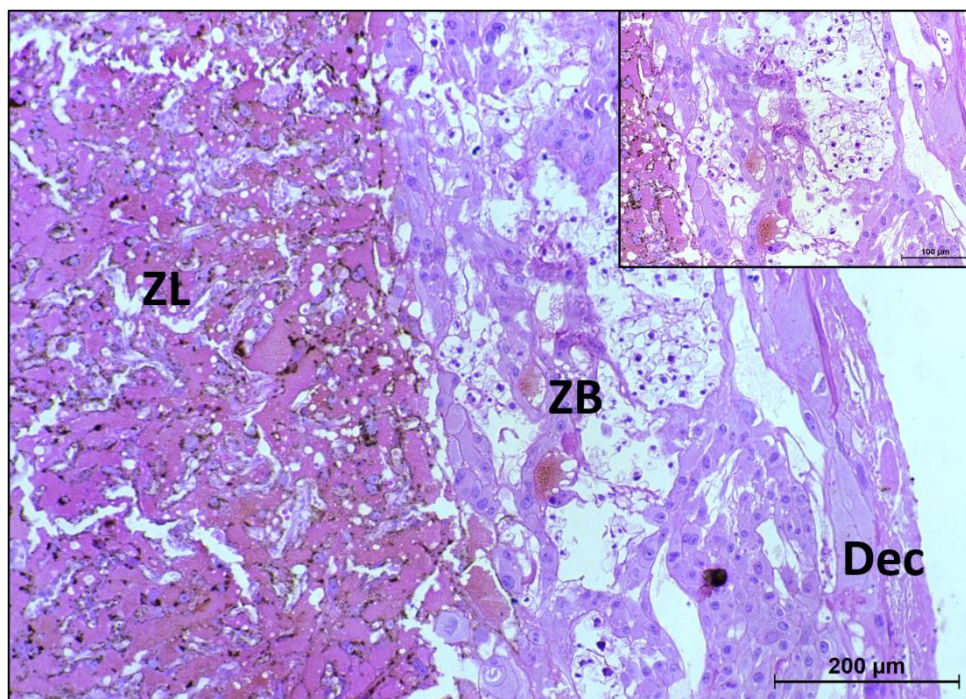


Figura 7: Fotomicrografia representativa da placenta do grupo controle. Objetiva 20x e 40x. Abreviações: ZL, zona do labirinto; ZB, zona basal; Dec, decídua.

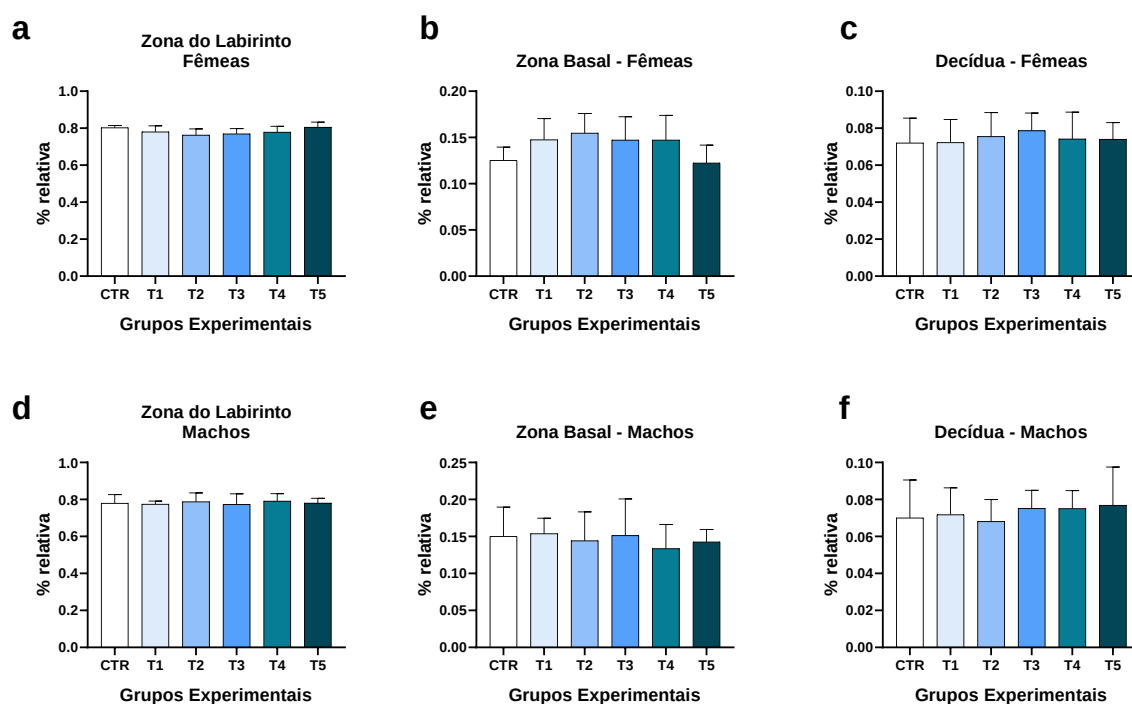


Figura 8: Morfometria da placenta nos diferentes grupos experimentais, na prole feminina e masculina, representando a quantificação do comprimento relativo da Zona do Labirinto (a,d), Zona Basal (b,e) e Decídua (c,f). Teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando $*p < 0,05$ comparado ao CTR.

4.3 Análises moleculares

A análise da expressão gênica de fatores relacionados à sinalização celular e à diferenciação trofoblástica mostrou aumento de *Ppar α* no grupo T5 quando comparado aos grupos CTR, T2 e T3 (Figura 9a). Ainda, houve um aumento na expressão de *Ppar γ* em T5 em relação ao CTR ($^{\circ}p < 0,06$, Figura 9b).

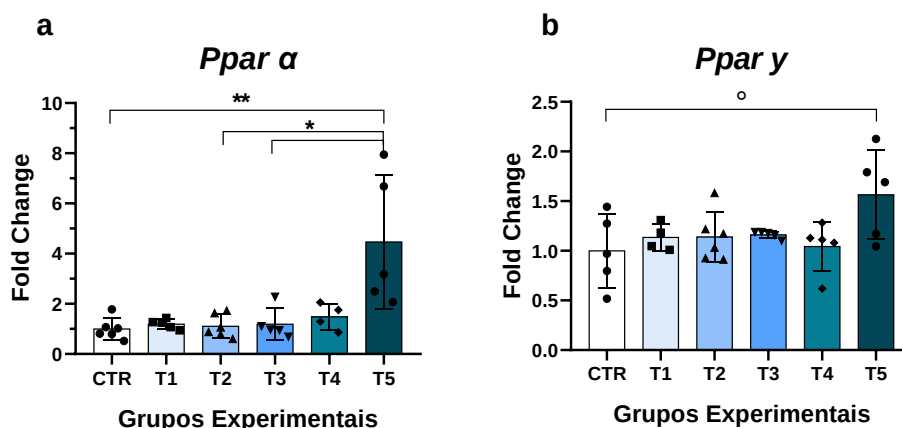


Figura 9: Gráficos representativos da expressão dos genes (a) *Ppar α* e (b) *Ppar γ*; a partir da análise por RT-qPCR. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{\Delta\Delta CT}$ e os valores expressos pela média $\pm$ DP ($n=5$ /grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando $^{**}p < 0,01$ ou $^{\circ}p < 0,06$ comparado ao CTR.

A expressão gênica dos fatores *Vegf*, *Igf-1*, e *Fgf* mostrou-se aumentada no grupo tratado com nanoplástico (T3) quando comparada ao grupo CTR (Figura 10a-c). Além disso, a expressão de *Vegf* aumentou nos grupos T3 e T4 em relação ao CTR, e em T4 em relação a T1 (Fig. 10a). Já a expressão do *Igf-1* aumentou nos grupos T1, T3 e T4 quando comparado ao CTR (Fig. 10b). Não houve alteração na expressão de *Plgf* entre os grupos experimentais (Fig. 10d).

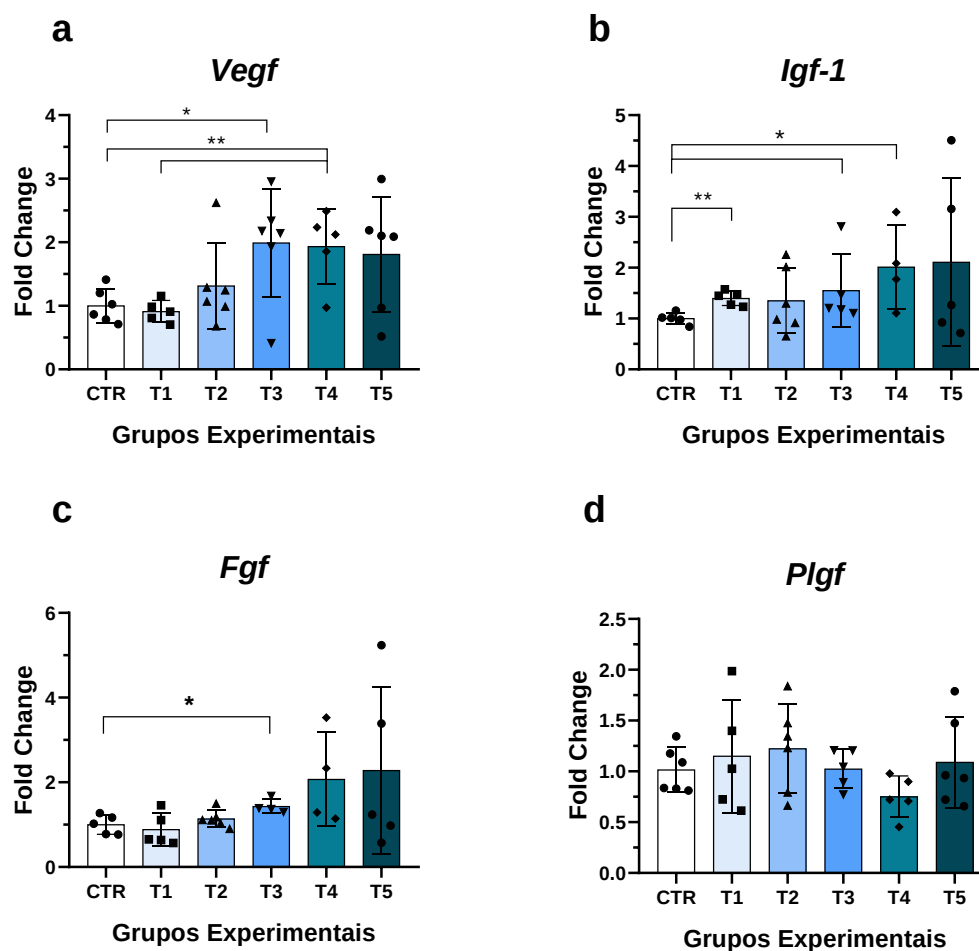


Figura 10: Gráficos representativos da expressão dos genes (a) *Vegf*, (b) *Igf-1*, (c) *Fgf* e (d) *Plgf*; a partir da análise por RT-qPCR. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{\Delta\Delta CT}$ e os valores expressos pela média $\pm$ DP (n=5/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando *p<0,05 e **p<0,01 comparado ao CTR.

Em relação a análise de vias de biossíntese de glicocorticoides, não houve alteração significativa entre os grupos de tratamento na expressão gênica de *Cyp11b1*, enzima responsável por converter deoxi-corticosterona em corticosterona, e *Hsd11b2*, enzima que converte corticosterona (glicocorticoide ativo) em cortisona (forma inativa) (Fig. 11a, b).

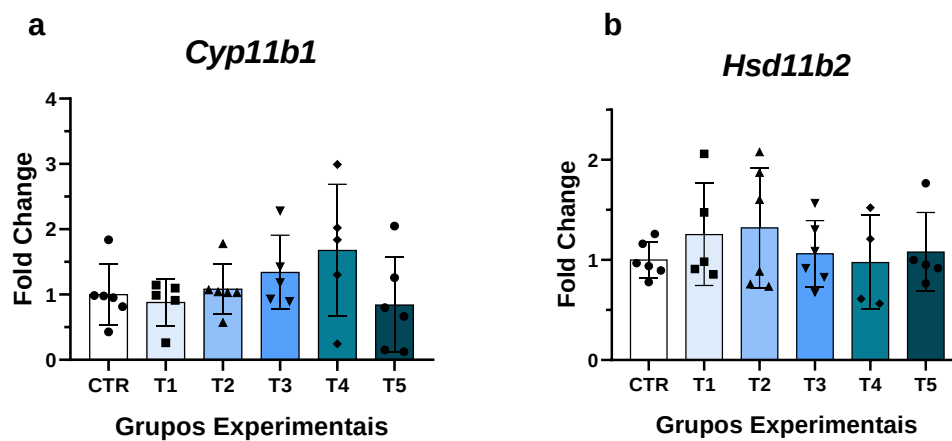


Figura 11: Gráficos representativos da expressão dos genes **(a)** *Cyp11b1* e **(b)** *Hsd11b2*; a partir da análise por RT-qPCR. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata. A expressão dos genes é dada pela quantificação do $2^{\Delta\Delta CT}$ e os valores expressos pela média $\pm$ DP ($n=5$ /grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando $p<0,05$ comparado ao CTR.

A análise da expressão proteica por WB mostrou que não houve alteração significativa nos níveis de VEGF (Fig. 12a). No entanto, um aumento da expressão de IGF-1 no grupo T3 em relação ao CTR foi observado (Fig. 12b).

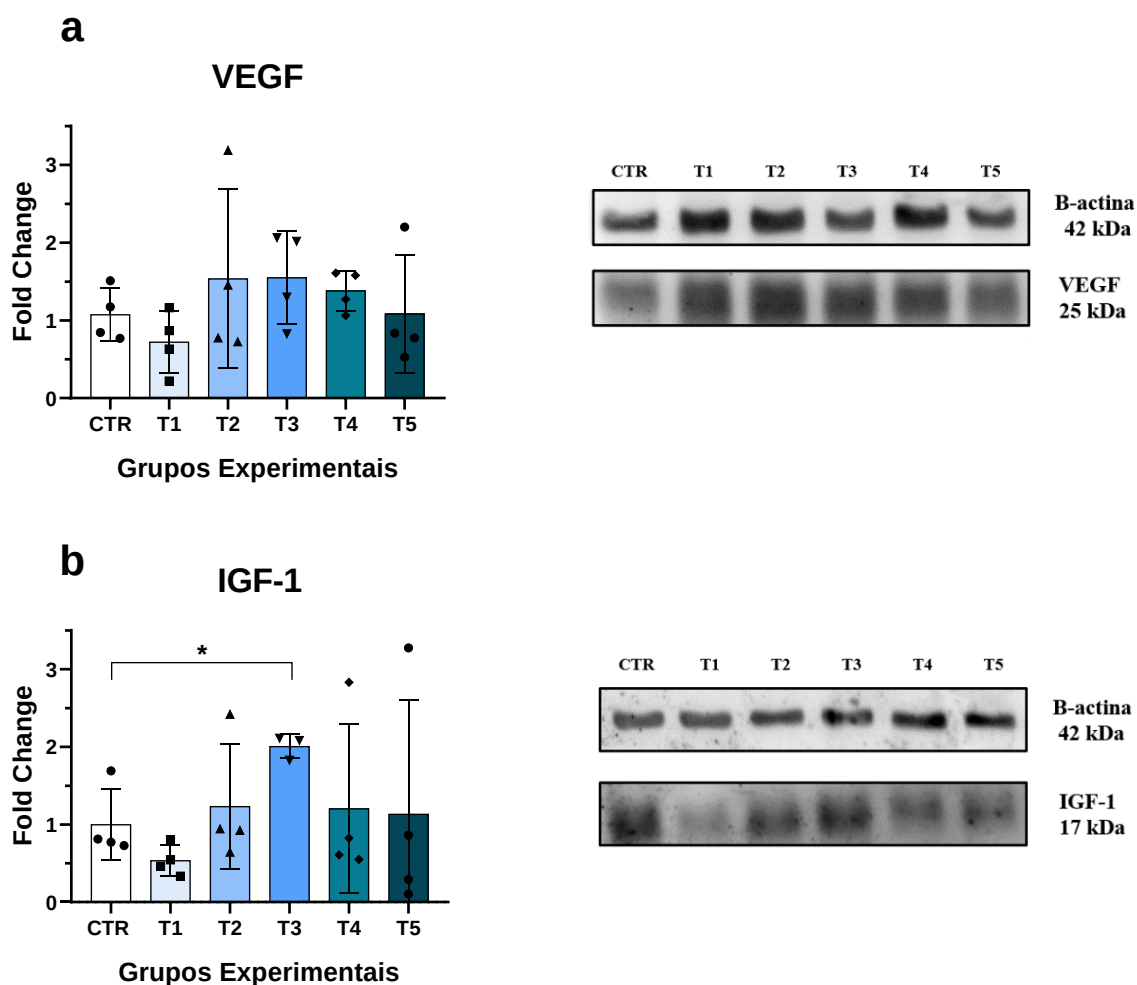


Figura 12: Gráficos representativos da expressão proteica de (a) VEGF, (b) IGF-1; a partir da análise por Western Blotting. A expressão das proteínas é dada pela densitometria de bandas, com as amostras e corridas representadas, assim como o endógeno (B-actina) e os pesos moleculares à direita. Os valores expressos pela média $\pm$ DP (n=5/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando $*p<0,05$ comparado ao CTR.

4.4 Avaliação do perfil oxidativo

Em relação à avaliação do perfil oxidativo das placentas coletadas observou-se redução do TBARS no grupo T2 em relação ao CTR (Fig. 13a). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou-se reduzida nos grupos T2 e T3 em relação ao CTR (Fig. 13b), já a atividade da catalase (CAT) apresentou aumento no grupo T3 em relação ao CTR (Fig. 13c). A glutiona S-transferase demonstrou redução no grupo T2 em relação ao CTR (Fig. 13d).

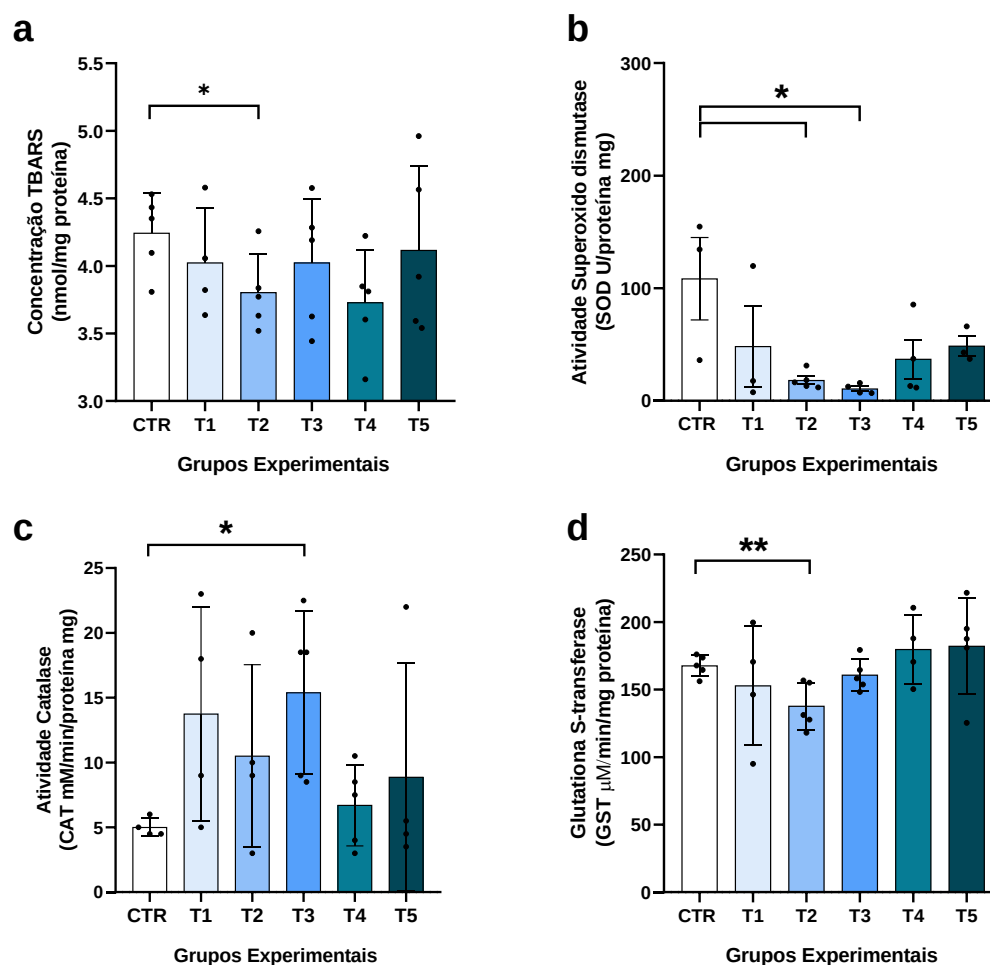


Figura 13: Gráficos representativos do perfil oxidativo das placentas das ratas **(a)** concentração de TBARS, **(b)** atividade da SOD, **(c)** atividade da CAT e **(d)** glutathiona s-transferase. Os valores expressos pela média $\pm$ DP (n=5/grupo); teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando *p<0,05 ou **p<0,01 comparado ao CTR.

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo é inédito em demonstrar os efeitos da mistura de ftalatos associada aos nanoplasticos na biologia do desenvolvimento, especialmente sobre a placenta. Nossos dados apontaram para efeitos adversos na saúde reprodutiva materna e na placenta, mostrando alterações biométricas, na síntese de RNAs mensageiros e proteínas que codificam fatores de crescimento e diferenciação celular de trofoblastos, bem como em enzimas relacionadas ao equilíbrio redox na placenta.

A embriogênese é um período crucial para o desenvolvimento inicial e pode ser sensível a fatores ambientais e nutricionais, modulando o processo de implantação. Há diversos estudos realizados que evidenciaram os efeitos sistêmicos de DEs na fertilidade feminina (Caserta et

al., 2021). Realizar o cálculo da taxa de perda pré-implantacional, que leva em consideração a porcentagem de embriões que não se implantaram no útero em relação ao total que foi produzido, é um parâmetro importante para avaliar o sucesso do processo de implantação e, consequentemente, da saúde reprodutiva. Aqui, observamos um aumento na taxa de perda pré-implantação em T3, T4 e T5, grupos expostos a nanoplasticos (isolados e em conjunto com a mistura de ftalatos). O processo de implantação e decidualização são regulados por diversos fatores moleculares, proteicos e hormonais (Dey et al., 2004). Hormônios como estrógeno e progesterona estão envolvidos na recepção do endométrio ao blastocisto, por meio da interação com os seus receptores. Os ftalatos, atuando como DEs, podem inibir a atividade desses hormônios e alterar o processo de receptividade endometrial e implantação do blastocisto, aumentando as chances de ocorrer perdas pré-implantacional, como visto neste trabalho. Além disso, os grupos com perdas pré-implantação são os grupos com NPs, o que nos leva a hipotetizar que os NPs podem modificar o ambiente uterino, alterando o início da implantação e levando à implantação tardia, após o 5º dia gestacional, como visto neste estudo.

Em um estudo com roedores, após exposição a altas doses de DEHP durante a gestação, os pesquisadores observaram um comprometimento da receptividade do endométrio e redução de implantações, assim como outras alterações na expressão gênica e proteica de receptores hormonais (Li et al., 2012). Além disso, outros estudos com roedores mostraram que a exposição aos MNPs causou impactos reprodutivos, como redução dos níveis circulantes de hormônios e menores taxas de implantações de embriões (Wei et al., 2022; Zurub et al., 2024). Esses resultados indicam que a exposição aos ftalatos e NPs podem alterar parâmetros reprodutivos e de fertilidade feminina, ao reduzir a taxa de pré-implantação. Assim como a embriogênese, a organogênese, que se inicia após a gastrulação, e em ratos ocorre entre o E6 ao E8, é um período suscetível a insultos externos que podem levar a malformações ou disfunções em diferentes órgãos. Apesar disso, não observamos alterações na estrutura externa dos fetos, e as avaliações dos parâmetros viscerais e esqueléticos não mostraram mudanças significativas (dados não publicados).

Os dados obtidos no presente estudo mostraram que o tratamento, durante a gestação, não foi capaz de alterar o peso corpóreo materno, mas reduziu o peso placentário e aumentou a eficiência placentária apenas da prole masculina no grupo T3. O suprimento placentário de nutrientes é um dos principais determinantes do crescimento *in útero*, e a redução experimental no crescimento da placenta pode levar ao aumento da eficiência, calculado como grama de feto

produzido por grama de placenta. Assim, a relação do peso feto-placentário (F:P) corresponde a uma das formas de avaliar o suprimento e a eficiência placentária (Fowden et al., 2009; Coan et al., 2010). Essa relação é um dado comumente utilizado para avaliar como a placenta se adaptou e respondeu às necessidades nutricionais e fisiológicas do feto. Caso haja redução na eficiência placentária, pode significar que houve uma transferência de nutrientes por grama de placenta menor, já um aumento na eficiência, seria um aumento na transferência (Fowden et al., 2009; Hayward et al., 2016). Alguns estudos sobre a exposição aos ftalatos, durante a pré-concepção ou gestação, já foram associados a condições adversas como restrição do crescimento intrauterino (RCIU), baixo peso ao nascer, alterações no desenvolvimento embrionário e função placentária, reduzindo o peso fetal e placentário (Zong et al., 2015; Shen et al., 2017; Mustieles et al., 2019). Estudos com nanoplasticos são mais escassos para esse parâmetro, entretanto, um estudo recente observou a translocação de nanoesferas de poliestireno da placenta para o feto, e seus efeitos materno-fetais como a redução do peso das placentas e o aumento na eficiência placentária (Cary et al., 2023). Além disso, para dar o suporte adequado no crescimento fetal, as placentas grandes e pequenas adotam estratégias diferentes no final da gestação, e podem ter reações de adaptações (morfológicas ou funcionais) e de sinalização para o feto dependendo das condições ambientais e da gravidade do insulto (Fowden et al., 2009). A partir desse cenário, os nossos resultados sugerem que houve algum desbalanço entre o fornecimento de nutrientes da placenta para o feto, pois a relação F:P na prole masculina estava aumentada, devido à redução dos pesos placentários no grupo exposto aos nanoplasticos. Entretanto, a função placentária de manter o fornecimento de nutrientes para o feto pode ser determinada por outros fatores, como a atividade e expressão de transportadores, não avaliados neste trabalho.

Como um órgão endócrino, a placenta desempenha um papel importante na sinalização hormonal e se torna alvo de substâncias químicas que atuam como interferentes endócrinos (Warner et al., 2021). Os ftalatos e seus metabólitos agem como ligantes para receptores nucleares, como receptores de estrogênio (ER) e androgênio (AR), e receptores ativados por proliferador de peroxissomos (PPAR), sendo este último importante na implantação e invasão trofoblástica (Fournier et al., 2008), no desenvolvimento embrionário, na diferenciação de tecidos, como trofoblasto (Barak et al., 1999), indução da vascularização placentária e angiogênese (Asami-Miyagishi et al., 2004), metabolismo lipídico (Latruffe; Vamecq, 1997), secreção hormonal e respostas inflamatórias, associadas a diabetes mellitus gestacional, pré-eclâmpsia e RCIU (Holdsworth-Carson et al., 2010). Na placenta, o PPAR é expresso no

trofoblasto, nas EVTs em humanos e no labirinto em roedores, e agem como fatores de transcrição dependentes de ligante. Foi relatado em camundongos knockout para PPAR γ , que a ausência desse fator de transcrição resulta em letalidade fetal, demonstrando que esse gene está relacionado com a diferenciação trofoblástica e vascularização placentária, importante para a região do labirinto (Barak et al., 1999). Nossos resultados mostraram que a expressão gênica de duas isoformas do Ppar, α e γ , aumentou no grupo T5, indicando um possível mecanismo da associação dos ftalatos e NPs sobre o desenvolvimento placentário, mediado por Ppar. Ainda, esse aumento pode refletir no aumento de fetos PIP no T5, visto que outros trabalhos associaram a expressão gênica e proteica aumentadas de PPAR α e γ nas placentas de fetos com restrição de crescimento intrauterino (Holdsworth-Carson et al., 2010). Outro estudo demonstrou que as expressões de mRNA e proteína das duas isoformas aumentaram após exposição gestacional a DEHP de maneira dose dependente (750 ou 1500 mg/kg/dia) (Xu et al., 2008), sugerindo que o PPAR α e γ podem estar envolvidos na regulação controlada por DEHP. Além disso, foi demonstrado que ftalatos e seus metabólitos podem inibir a invasão do EVT, pela regulação negativa de metaloproteinases da matriz (MMPs), por meio da via de PPAR γ (Gao et al., 2017), o que pode explicar a taxa de perda pré-implantacional reduzida nos grupos T4 e T5. Dessa forma, a regulação gênica inadequada desses receptores pode afetar negativamente a placenta, e causar danos para o feto e para a mãe.

Os fatores de crescimento atuam na regulação de vários processos placentários e fetais, incluindo invasão do trofoblasto, angiogênese, proliferação celular, remodelação vascular materna, homeostase tecidual, entre outros (Rossant; Cross, 2001; Kunath et al., 2014; Basak; Varma; Duttaroy, 2023). O fator de crescimento endotelial vascular (*Vegfa*), um dos principais fatores pró-angiogênicos, exerce um papel crítico na vasculatura da placenta que sustenta a troca de nutrientes e oxigênio entre o feto e a mãe (Sandovici et al., 2012), e no início da gestação em humanos é encontrado em células do sinciciotrofoblasto (STB) viloso, estromais vilosas, decíduais e EVC, e no termo, são encontrados no sinciciotrofoblasto (STB) e células extravilosas (EVC). *Vefg* é induzido por fator induzível de hipóxia (*Hif-1*) e se liga a duas isoformas do receptor tirosina quinase (VEGFR1/Flt1 ou VEGFR2/Kdr), e a inativação desse gene ou de seus receptores pode levar a morte de embriões em roedores (Challier; Vervelle; Uzan, 2001), destacando sua importância. Outro fator pró-angiogênico é de crescimento de fibroblasto (*Fgf*) que atua na manutenção e proliferação inicial de células do trofoblasto, no momento da invasão blastocística, por meio da via FGF/MAPK. A termo, em humanos, FGF é positivo em células do STB, células de Houfbauer e vasos (Kunath et al., 2014). O aumento

desses genes nos grupos de tratamento T3 pode estar relacionado a um mecanismo compensatório sob condições de hipóxia, estresse oxidativo ou até danos placentários, sendo esse último explicado pelo desbalanço de peso placentário. Além disso, um sistema de baixa perfusão materna, vilosidades imaturas nas placentas e inflamação já foram associadas a fetos com RCIU (Macara et al., 1996; Tachibana; Nakayama; Miyoshi, 2016). No entanto, outro fator pró-angiogênico, o fator de crescimento placentário (*Plgf*) não mostrou alteração significativa entre os grupos. O *Plgf* encontrado em células STB e CTB, e no endotélio, possui sequência de aminoácidos semelhante ao *Vegf* e responde diretamente às concentrações de oxigênio. Em um estudo caso-controle foi observado a associação entre os metabólitos de ftalatos e bisfenol A (BPA) encontrados na urina de gestantes e reduções em fatores pró-angiogênicos, como *Plgf*, sugerindo que a exposição a esses DEs pode causar a perfusão placentária deficiente (Ferguson et al., 2015).

O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*Igf-1*), conhecido por promover a proliferação do trofoblasto, estimular o transporte de glicose na placenta, remodelação vascular materna, entre outras funções essenciais (Sferruzzi-Perri et al., 2017), já foi associado a placentas RCIU e normalmente, os IGFs são baixos em bebês recém-nascidos PIG em humanos (Randhawa; Cohen, 2005). Eles regulam atividade proliferativa e anti-apoptótica por meio da ligação com receptor e ativação das vias de sinalização MAPK e PI3K-AKT, respectivamente. Nesse estudo, esse fator de crescimento apresentou aumento na expressão gênica e proteica no grupo T3, o que pode significar que há um aumento da demanda de transcrição gênica de *Igf-1*, devido ao aumento de fetos nascidos PIP, como uma forma de compensação e tentativa de melhorar o fornecimento de nutriente da mãe para a placenta e da placenta para o feto, visto que a eficiência placentária aumentou nesse mesmo grupo. Como visto anteriormente, estudos com a exposição a ftalatos e nanoplásticos possuem efeitos tóxicos no feto e na placenta, e podem causar restrição do crescimento fetal (Aghaei et al., 2022; CHEN et al., 2023). Aqui demonstramos que o impacto do tratamento com ftalatos e nanoplásticos desencadeia um aumento na expressão gênica de fatores de crescimento. Mesmo com esse aumento, o ambiente adverso induzido pela exposição gestacional pode restringir a eficácia desses fatores de crescimento. Ademais, a exposição a desreguladores endócrinos pode contribuir para a insuficiência placentária e para a restrição do crescimento fetal (Yu et al., 2024), mesmo que haja um aumento de *Igf-1* como reação compensatória desse desbalanço.

Os glicocorticoides são hormônios esteroides sintetizados, principalmente, pelas glândulas adrenais, sob ação do eixo hipotálamo-hipófise (hormônio liberador de corticotrofinas - CRH e hormônio adrenocorticotrófico - ACTH). Durante a gestação, essas substâncias desempenham um papel crucial para a promoção de adaptações metabólicas na mãe (Seckl, 2011; Fowden et al., 2015; Harris). No feto, os glicocorticoides podem originar-se de três fontes: passagem transplacentária da mãe, produção na placenta e secreção das glândulas adrenais fetais (Staud et al., 2006). Os níveis de glicocorticoides maternos são mais altos do que no feto, e apenas uma fração reduzida penetra na membrana placentária, por conta da ação da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (HSD11 β 2) (Harris; Seckl, 2011; Fowden et al., 2015). No entanto, a placenta secreta CRH, que atinge o feto e estimula a produção de ACTH e cortisol (McLean et al., 1995). No feto em desenvolvimento, esse eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) auxilia a produção do líquido surfactante nos pulmões, a maturação de outros tecidos fetais e no momento do parto (Staud et al., 2006). Estudos experimentais com roedores mostraram que o estresse pré-natal e a administração de glicocorticoides resultaram em baixo peso ao nascer e prejuízos neurocognitivos (Takahashi; Turner; Kalin, 1992; Vallée et al., 1999; Welberg; Seckl; Holmes, 2000). Outros estudos expuseram células placentárias a alguns tipos de ftalatos e observaram alteração na via esteroidogênica placentária (Xu et al., 2016; Leng et al., 2020). Entretanto, na análise de expressão gênica da *Cyp11b1*, enzima responsável por converter deoxi-corticosterona em corticosterona, e *Hsd11b2*, enzima que converte corticosterona em cortisona, não demonstrou alteração significativa.

Em relação a análise do perfil oxidativo das placentas, a redução de GSTpi, SOD e TBARS no grupo T2 é um resultado intrigante, já que a literatura evidencia que o estresse oxidativo é gerado por uma diminuição do sistema antioxidante frente ao excesso de radicais livres, o qual pode levar a impactos mitocondriais, celulares e teciduais, sendo fator de risco para pré-eclâmpsia e distúrbios gestacionais (Grzeszczak et al., 2023; Başeğmez et al., 2024). Apesar dos níveis de TBARS estarem diminuídos, o que indica uma menor formação de radicais livres, é possível considerar que a exposição aos ftalatos altera parcialmente o sistema antioxidante placentário, tornando-o suscetível ao estresse oxidativo. Ainda, essa condição não leva ao estresse pela quantidade diminuída de TBARS, entretanto isso pode indicar que o metabolismo energético placentário está prejudicado, ou seja, há menos β -oxidação de ácidos graxos e metabolismo glicídico, gerando menos transportadores de elétrons. Assim, esta condição é um indicativo de menor produção atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons e de síntese de ATP, o qual tem potencial de susceptibilizar a placenta a danos estruturais e

funcionais, com consequências adversas à prole. Em um estudo, Santos-Rosendo et al. (2020) demonstraram, em modelo de ratas obesas, uma diminuição nos níveis de TBARS e das atividades de SOD e CAT, com sobrecarga em vias de óxido nítrico, caracterizando possíveis mecanismos placentários adaptativos frente a adversidades gestacionais (Santos-Rosendo et al., 2020).

Por outro lado, o grupo T3 (exposição somente aos nanoplásticos) exibiu uma diminuição de SOD e aumento de CAT. SOD é responsável pela formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto CAT é uma das enzimas antioxidantes responsáveis pela sua degradação. Este é outro mecanismo que gera discussão, pois apesar de não haver um aumento dos radicais livres, aparentemente há uma sobrecarga da formação de H_2O_2 , todavia sem sua devida degradação pelo sistema subjacente. Portanto, é plausível considerar que as partículas de nanoplásticos tenham interferência direta sobre a cadeia transportadora de elétrons, biossíntese de aminoácidos e até mesmo ação enzimática. Nesse contexto, estudos recentes já demonstraram a citotoxicidade dos microplásticos em culturas de células pulmonares humanas, identificando distúrbios nos níveis de espécies reativas de oxigênio, no potencial de membrana mitocondrial e regulação da apoptose (Zhang et al., 2022). Outros estudos experimentais demonstraram que os microplásticos causam disfunção mitocondrial mediada pela NADPH oxidase 4, impactando o potencial de membrana e metabolismo energético celular em células respiratórias (Halimu et al., 2022; Lee et al., 2022).

Com isso, hipotetizamos que tanto os ftalatos em maior dose, quanto os nanoplásticos, podem interferir diretamente sobre a função mitocondrial nas células placentárias, o que abre caminho para futuros estudos que investiguem, isoladamente, a correlação direta entre esses dois fatores.

Os dados promissores e inéditos apresentados neste trabalho demonstram que os nanoplásticos de forma isolada, e em combinação com a mistura de ftalatos, foram mais efetivos em ocasionar alterações maternas e placentárias, quando comparados com os animais expostos somente a mistura. Esses resultados, assim como outros poucos relatados na literatura, demonstram que a combinação de nanoplásticos com outros agentes químicos pode aumentar os efeitos dessas substâncias sobre os tecidos biológicos.

6. REFERÊNCIAS

- AGHAEI, Z. et al. Maternal Exposure to Polystyrene Micro- and Nanoplastics Causes Fetal Growth Restriction in Mice. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 9, n. 5, p. 426–430, 10 maio 2022.
- ALSEN, M. et al. Endocrine Disrupting Chemicals and Thyroid Cancer: An Overview. **Toxics**, v. 9, n. 1, p. 1–26, 1 dez. 2021.
- ALVES, J. G. B.; ALVES, L. V. Early-life nutrition and adult-life outcomes. **Jornal de pediatria**, v. 100 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S4–S9, 1 mar. 2024.
- AQUINO, A. M. et al. Integrated transcriptome and proteome analysis indicates potential biomarkers of prostate cancer in offspring of pregnant rats exposed to a phthalate mixture during gestation and lactation. **Chemosphere**, v. 341, p. 140020, 1 nov. 2023.
- ASAMI-MIYAGISHI, R. et al. Expression and function of PPAR γ in rat placental development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 2, p. 497–501, 5 mar. 2004.
- BANERJEE, A.; SHELVER, W. L. Micro- and Nanoplastic-Mediated Pathophysiological Changes in Rodents, Rabbits, and Chickens: A Review. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 9, p. 1480–1495, 1 set. 2021.
- BARAK, Y. et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. **Molecular cell**, v. 4, n. 4, p. 585–595, 1999.
- BASAK, S.; VARMA, S.; DUTTARROY, A. K. Modulation of fetoplacental growth, development and reproductive function by endocrine disrupters. **Frontiers in endocrinology**, v. 14, 2023.
- BAŞEĞMEZ, M. et al. Protective Effects of Ascorbic Acid Against Cadmium-Induced Toxicity in the Placenta and Fetus of Rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 38, n. 11, p. e70053, 1 nov. 2024.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- CARY, C. M. et al. Ingested Polystyrene Nanospheres Translocate to Placenta and Fetal Tissues in Pregnant Rats: Potential Health Implications. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 4, 1 fev. 2023.
- CARRARA, I. M. et al. Looking beyond the skin: Cutaneous and systemic oxidative stress in UVB-induced squamous cell carcinoma in hairless mice. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 195, p. 17–26, 1 jun. 2019.
- CASERTA, D. et al. Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Endometrial Receptivity and Embryo Implantation: A Systematic Review of 34 Mouse Model Studies. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 13, 1 jul. 2021.
- CHALLIER, J. C.; VERVELLE, C.; UZAN, S. Ontogenesis of villi and fetal vessels in the human placenta. **Fetal diagnosis and therapy**, v. 16, n. 4, p. 218–226, 2001.

CHAVATTE-PALMER, P.; COUTURIER-TARRADE, A.; ROUSSEAU-RALLIARD, D. Intra-uterine programming of future fertility. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 59, n. 5, 1 maio 2024.

CHEN, H. et al. Exposure to dipentyl phthalate in utero disrupts the adrenal cortex function of adult male rats by inhibiting SIRT1/PGC-1 α and inducing AMPK phosphorylation. **Environmental toxicology**, v. 38, n. 5, p. 997–1010, 1 maio 2023.

COAN, P. M. et al. Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 3, p. 527–538, fev. 2010.

DE FREITAS, T. et al. Prenatal exposure to a mixture of different phthalates increases the risk of mammary carcinogenesis in F1 female offspring. Food and chemical toxicology: an international journal published for the **British Industrial Biological Research Association**, v. 156, 1 out. 2021.

DENG, Y. et al. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. **Scientific reports**, v. 7, 2017.

DEY, S. K. et al. Molecular cues to implantation. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 3, p. 341–373, jun. 2004.

DOULL, J. et al. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl) phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 29, n. 3, p. 327–357, 1999.

EPA. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. [s.l.: s.n.].

ERTHAL, R. P. et al. Exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal periods impairs testicular and sperm parameters in rats: Role of oxidative stress and testosterone. **Reproductive Toxicology**, v. 96, p. 17–26, 1 set. 2020.

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

FERGUSON, K. K. et al. Phthalate metabolites and bisphenol-A in association with circulating angiogenic biomarkers across pregnancy. **Placenta**, v. 36, n. 6, p. 699–703, 1 jun. 2015.

FORTE, M. et al. Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 31, p. 126–136, 1 mar. 2016.

FOURNIER, T. et al. Role of nuclear receptors and their ligands in human trophoblast invasion. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 2, p. 161–170, 1 abr. 2008.

FOWDEN, A. L. et al. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. **The Journal of physiology**, v. 587, n. Pt 14, p. 3459–3472, 15 jul. 2009.

FOWDEN, A. L. et al. Glucocorticoids as regulatory signals during intrauterine development. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 12, p. 1477–1487, 1 dez. 2015.

GAO, F. et al. Mono-2-ethylhexyl phthalate inhibits human extravillous trophoblast invasion via the PPAR γ pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 327, p. 23–29, 15 jul. 2017.

GRZESZCZAK, K. et al. Oxidative Stress in Pregnancy. **Biomolecules** 2023, Vol. 13, Page 1768, v. 13, n. 12, p. 1768, 9 dez. 2023.

HALIMU, G. et al. Toxic effects of nanoplastics with different sizes and surface charges on epithelial-to-mesenchymal transition in A549 cells and the potential toxicological mechanism. **Journal of hazardous materials**, v. 430, 15 maio 2022.

HARRIS, A.; SECKL, J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. **Hormones and behavior**, v. 59, n. 3, p. 279–289, mar. 2011.

HAYWARD, C. E. et al. Placental Adaptation: What Can We Learn from Birthweight: Placental Weight Ratio? **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. FEB, p. 28, 5 fev. 2016.

HOLDSWORTH-CARSON, S. J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia. **Placenta**, v. 31, n. 3, p. 222–229, mar. 2010.

INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. et al. The Role of Mucin in the Toxicological Impact of Polystyrene Nanoparticles. **Materials (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 5, 3 maio 2018.

JEONG, B. et al. Maternal exposure to polystyrene nanoplastics causes brain abnormalities in progeny. **Journal of Hazardous Materials**, v. 426, p. 127815, 15 mar. 2022.

JIN, Y. et al. Impacts of polystyrene microplastic on the gut barrier, microbiota and metabolism of mice. **Science of The Total Environment**, v. 649, p. 308–317, 1 fev. 2019.

KAVLOCK, R. et al. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: Phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 5, p. 529–653, 2002.

KEEN, J; HABIG, WH; JAKOBY, WB. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, 251:6153–6188, 1976.

KUNATH, T. et al. Developmental differences in the expression of FGF receptors between human and mouse embryos. **Placenta**, v. 35, n. 12, p. 1079–1088, 2014.

LAPEHN, S.; PAQUETTE, A. G. The Placental Epigenome as a Molecular Link Between Prenatal Exposures and Fetal Health Outcomes Through the DOHaD Hypothesis. **Current environmental health reports**, v. 9, n. 3, p. 490–501, 1 set. 2022.

LATRUFFE, N.; VAMECQ, J. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. **Biochimie**, v. 79, n. 2–3, p. 81–94, 1997.

LEE, S. E. et al. Impact of Micro- and Nanoplastics on Mitochondria. **Metabolites** 2022, Vol. 12, Page 897, v. 12, n. 10, p. 897, 23 set. 2022.

LENG, Y. et al. Phthalate esters and dexamethasone synergistically activate glucocorticoid receptor. **Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering**, v. 55, n. 14, p. 1581–1588, 2020.

LI, R. et al. Effects of DEHP on endometrial receptivity and embryo implantation in pregnant mice. **Journal of hazardous materials**, v. 241–242, p. 231–240, 30 nov. 2012.

- LI, X. et al. Intergenerational neurotoxicity of polystyrene nanoplastics in offspring mice is mediated by dysfunctional microbe-gut-brain axis. **Environment International**, v. 192, p. 109026, 1 out. 2024.
- LU, L. et al. Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. **The Science of the total environment**, v. 631–632, p. 449–458, 1 ago. 2018.
- LUO, T. et al. Maternal exposure to different sizes of polystyrene microplastics during gestation causes metabolic disorders in their offspring. **Environmental pollution** (Barking, Essex: 1987), v. 255, n. Pt 1, 1 dez. 2019.
- MACARA, L. et al. Structural analysis of placental terminal villi from growth-restricted pregnancies with abnormal umbilical artery Doppler waveforms. **Placenta**, v. 17, n. 1, p. 37–48, 1996.
- MCLEAN, M. et al. A placental clock controlling the length of human pregnancy. **Nature medicine**, v. 1, n. 5, p. 460–463, 1995.
- MUSTIELES, V. et al. Placental weight in relation to maternal and paternal preconception and prenatal urinary phthalate metabolite concentrations among subfertile couples. **Environmental research**, v. 169, p. 272–279, 1 fev. 2019.
- PRIETL, B. et al. Nano-sized and micro-sized polystyrene particles affect phagocyte function. **Cell biology and toxicology**, v. 30, n. 1, p. 1–16, 2014.
- RADKE, E. G. et al. Phthalate exposure and male reproductive outcomes: A systematic review of the human epidemiological evidence. **Environment international**, v. 121, n. Pt 1, p. 764–793, 1 dez. 2018.
- RADKE, E. G. et al. Phthalate exposure and neurodevelopment: A systematic review and meta-analysis of human epidemiological evidence. **Environment International**, v. 137, p. 105408, 1 abr. 2020.
- RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols** 2007 1:6, v. 1, n. 6, p. 3159–3165, 31 jan. 2007.
- RANDHAWA, R.; COHEN, P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, n. 1–2, p. 84–90, 2005.
- RENAULT, D. et al. The Plasticene era: Current uncertainties in estimates of the hazards posed by tiny plastic particles on soils and terrestrial invertebrates. **The Science of the total environment**, v. 927, 1 jun. 2024.
- REZNICK, A. Z.; PACKER, L. [38] Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. C, p. 357–363, 1 jan. 1994.
- ROSSANT, J.; CROSS, J. C. Placental development: lessons from mouse mutants. **Nature reviews. Genetics**, v. 2, n. 7, p. 538–548, jul. 2001.
- SANDOVICI, I. et al. Placental adaptations to the maternal-fetal environment: implications for fetal growth and developmental programming. **Reproductive biomedicine online**, v. 25, n. 1, p. 68–89, jul. 2012.
- SANTOS-ROSENDO, C. et al. Placental Adaptive Changes to Protect Function and Decrease Oxidative Damage in Metabolically Healthy Maternal Obesity. **Antioxidants** 2020, Vol. 9, Page 794, v. 9, n. 9, p. 794, 26 ago. 2020.

- SCARANO, W. R. et al. Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture During Prostate Development Induces MicroRNA Upregulation and Transcriptome Modulation in Rats. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 84–97, 1 set. 2019.
- SFERRUZZI-PERRI, A. N. et al. Placental phenotype and the insulin-like growth factors: resource allocation to fetal growth. **The Journal of physiology**, v. 595, n. 15, p. 5057–5093, 1 ago. 2017.
- SHEN, R. et al. Maternal di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure during pregnancy causes fetal growth restriction in a stage-specific but gender-independent manner. **Reproductive toxicology** (Elmsford, N.Y.), v. 67, p. 117–124, 1 jan. 2017.
- SOOMRO, M. H. et al. Associations between the chemical exposome and pregnancy induced hypertension. *Environmental Research*, v. 237, p. 116838, 15 nov. 2023.
- STAUD, F. et al. Corticosterone transfer and metabolism in the dually perfused rat placenta: effect of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. **Placenta**, v. 27, n. 2–3, p. 171–180, fev. 2006.
- TACHIBANA, M.; NAKAYAMA, M.; MIYOSHI, Y. Placental examination: prognosis after delivery of the growth-restricted fetus. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v. 28, n. 2, p. 95–100, 1 abr. 2016.
- TAKAHASHI, L. K.; TURNER, J. G.; KALIN, N. H. Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. **Brain Research**, v. 574, n. 1–2, p. 131–137, 6 mar. 1992.
- VALLÉE, M. et al. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: A longitudinal study in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 2906–2916, ago. 1999.
- VERNET, C. et al. In Utero Exposure to Select Phenols and Phthalates and Respiratory Health in Five-Year-Old Boys: A Prospective Study. **Environmental health perspectives**, v. 125, n. 9, 1 set. 2017.
- WANG, Y.; ZHU, H.; KANNAN, K. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. **Toxics**, v. 7, n. 2, p. 21, 2019.
- WARNER, G. R. et al. Placental outcomes of phthalate exposure. **Reproductive toxicology** (Elmsford, N.Y.), v. 103, p. 1, 1 ago. 2021.
- WEI, Z. et al. Comparing the effects of polystyrene microplastics exposure on reproduction and fertility in male and female mice. **Toxicology**, v. 465, 15 jan. 2022.
- WELBERG, L. A. M.; SECKL, J. R.; HOLMES, M. C. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, the foetoplacental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 1047–1054, 2000.
- XU, R. AI et al. Structure-activity relationships of phthalates in inhibition of human placental 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and aromatase. **Reproductive Toxicology**, v. 61, p. 151–161, 1 jun. 2016.
- XU, Y. et al. Maternal Di-(2-ethylhexyl)-phthalate Exposure Influences Essential Fatty Acid Homeostasis in Rat Placenta. **Placenta**, v. 29, n. 11, p. 962–969, 1 nov. 2008.

YONG, C. Q. Y.; VALIYAVEETIL, S.; TANG, B. L. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 5, 1 mar. 2020.

YU, Y. et al. Prenatal phthalate exposure and birth size: a systematic review and meta-analysis. **International journal of environmental health research**, v. 34, n. 7, p. 2813–2829, 2024.

ZHANG, H. et al. Pulmonary toxicology assessment of polyethylene terephthalate nanoplastic particles in vitro. **Environment International**, v. 162, p. 107177, 1 abr. 2022.

ZHOU, C.; GAO, L.; FLAWS, J. A. Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 318, p. 49–57, 1 mar. 2017.

ZONG, T. et al. Maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate disrupts placental growth and development in pregnant mice. **Journal of hazardous materials**, v. 297, p. 25–33, 1 out. 2015.

ZURUB, R. E. et al. Microplastics exposure: implications for human fertility, pregnancy and child health. **Frontiers in endocrinology**, v. 14, 2024.

CAPÍTULO 3: PARÂMETROS E ALTERAÇÕES BIOMÉTRICAS DA PROLE

Exposição aos plásticos durante a gestação de ratas e os efeitos no desenvolvimento e na programação fetal: uma abordagem DOHaD

Natália Magosso¹, Patrick Vieira de Souza¹, Mirella Franco Moreira¹, Vanessa Aguiar Rocha¹, Matheus Naia Fioretto¹; Victória Cristina Pinha¹, Gabriel Aquino de Souza Maia¹, Vinícius Luís Rocha da Silva Maria², Wellerson Rodrigo Scarano¹

¹ Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, São Paulo, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, UNESP, Bauru, SP, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento fetal é um período crítico no qual ocorre a formação e maturação dos órgãos e sistemas do organismo. Esse período é altamente suscetível a fatores/estressores ambientais, como nutrição materna, estresse, álcool, nicotina, agentes tóxicos e desreguladores endócrinos (Choudhary et al., 2003). Interferências e perturbações nesse momento podem programar o indivíduo a ter um aumento do risco de desenvolver doenças ao longo da vida (Zhang; Ho, 2011). No contexto DOHaD, a placenta desempenha um papel essencial na regulação entre o ambiente materno e fetal. Alterações moleculares, como visto no capítulo 2, ou funcionais podem impactar no transporte de nutrientes e hormônios, influenciando na programação fetal (Lapehn; Paquette, 2022). Além disso, a exposição aos poluentes ambientais, como ftalatos e nanoplásticos, durante a gestação tem sido muito investigada devido a capacidade de afetar a programação epigenética, alterar o microambiente intrauterino e o desenvolvimento fetal (Lapehn; Paquette, 2022; Zurub et al., 2024).

Dessa forma, estudos experimentais demonstram que estes poluentes, principalmente os ftalatos podem impactar o desenvolvimento de órgãos reprodutores (Scarano et al., 2025), modificar a arquitetura vascular da placenta (Hirke et al., 2023), e reduzir a distância anogenital

(DAG), um marcador sensível e suscetível a exposição a DEs (Radke et al., 2018). Essas alterações podem resultar em restrição de crescimento intrauterino (RCIU) (Tachibana; Nakayama; Miyoshi, 2016), e modificações na programação metabólica e imunológica (Reynolds et al., 2019), que vão aumentar a suscetibilidade a doenças mais tarde na vida desses descendentes. Em um estudo com roedores, a exposição ao ftalato DBP (500 mg/kg/dia) durante a gestação e lactação resultou em fetos subdesenvolvidos e um aumento no número de absorções, além de prejudicar o sistema neuroendócrino, ao aumentar os níveis de cortisol e reduzir a serotonina em filhotes com um mês de idade, e ainda demonstrou efeitos antiandrogênicos nas três gerações sucessivas (Radha; Basha, 2024). Em relação aos nanoplásticos, muitos estudos mostraram a translocação placentária de partículas de NPs em modelos de roedores (Cary et al., 2023), e conseqüentemente a sua presença em diversos órgãos maternos e fetais, como coração, pulmão, rim, fígado e cérebro. Em um recente estudo com ratos Sprague-Dawley, foi relatado que partículas de MNPs permanecem em tecidos fetais e em filhotes jovens de duas semanas, após exposição materna, via aerossol, demonstrando a passagem, a acumulação biológica e a permanência dessas partículas dentro de um modelo materno-fetal (Moreno et al., 2024).

Portanto, investigar as conseqüências do impacto da exposição materna aos ftalatos e nanoplásticos, enfatizando na saúde da prole, pode trazer resultados biológicos valiosos para compreender as conseqüências sobre o desenvolvimento fetal. Dessa forma, hipotetizamos que a exposição aos nanoplásticos e ftalatos, isolados ou em combinação, afeta negativamente o desenvolvimento fetal, ao afetar diretamente a saúde materna e a morfofisiologia placentária, resultando em alterações fenotípicas e moleculares que resultam em conseqüências para a prole em desenvolvimento.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da exposição gestacional a uma mistura de ftalatos e aos nanoplásticos de poliestireno (isolados e combinados) sobre o desenvolvimento fetal de sua prole, ao examinar medidas biométricas dos fetos ao final do período gestacional (DG20) e analisar parâmetros viscerais e esqueléticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o mesmo descrito no Capítulo 2. Machos adultos da

linhagem Sprague Dawley (n=15), com 120 dias de idade (DPN), pesando aproximadamente 300g e fêmeas adultas (n=50), no DPN120, pesando aproximadamente 300g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do IBB/UNESP, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23-25°C) e receberam água (em garrafas de vidro) e ração para roedores à vontade. Após o período de aclimação dos animais, eles foram separados para o acasalamento, que foi realizado durante o período escuro do ciclo, colocando-se de duas fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhez (DG0) foi determinado pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro.

As ratas prenhes foram divididas aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=6-8/grupo): CTR: grupo controle que recebeu o óleo de milho/água; T1: recebeu 20 µg/kg/dia da mistura de ftalatos (MF) diluídos em óleo de milho; T2: recebeu 200 mg/kg/dia da mistura de ftalatos (MF) diluídos em óleo de milho; T3: recebeu nanoesferas de poliestireno (NPs) de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg/dia diluído em água destilada; T4: recebeu 20µg/kg/dia da MF + NPs de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg; e T5: recebeu 200mg/kg/dia da MF+ NPs de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg. As ratas de cada grupo receberam o tratamento, via oral, do dia gestacional 5 (DG5) ao DG20.

Os animais dos grupos T1, T2, T4 e T5 receberam as respectivas doses da mistura de ftalatos na seguinte proporção: 21% DEHP (di-2-etilhexil ftalato), 35% DEP (dietil ftalato), 15% DBP (di-n-butil ftalato), 8% DiBP (diisobutil ftalato), 5% BBzP (butil benzil ftalato), e 15% DiNP (diisononil ftalato). A proporção da mistura se baseia na composição dos principais ftalatos detectados em amostras de urina de mulheres grávidas em Illinois, EUA (Zhou; Gao; Flaws, 2017). Os ftalatos e nanoplástico foram obtidos da Sigma Aldrich ®: DEHP: 36735, DEP: 524972, DBP: 524980, DiBP: 152641, BBzP: 308501, DiNP: 376663; nanoesferas de poliestireno (nanoplásticos): 43302.

No DG20, 6-8 ratas por grupo foram anestesiadas com uma mistura de xilazina (5mg/kg corpóreo) e cetamina (80mg/kg corpóreo) para laparotomia, e em seguida, foi realizada punção cardíaca para coleta do sangue. Os fetos e as suas respectivas placentas foram isolados e pesados. Os fetos foram medidos quanto as distâncias crânio-caudal, encefálica e anogenital, em seguida foram fixados para posterior estudo visceral e esquelético. O delineamento experimental está representado na figura 14. Imagem criado pelo app BioRender.com (Figura 14).

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (ANEXO 2) (Protocolo: 1174020523).

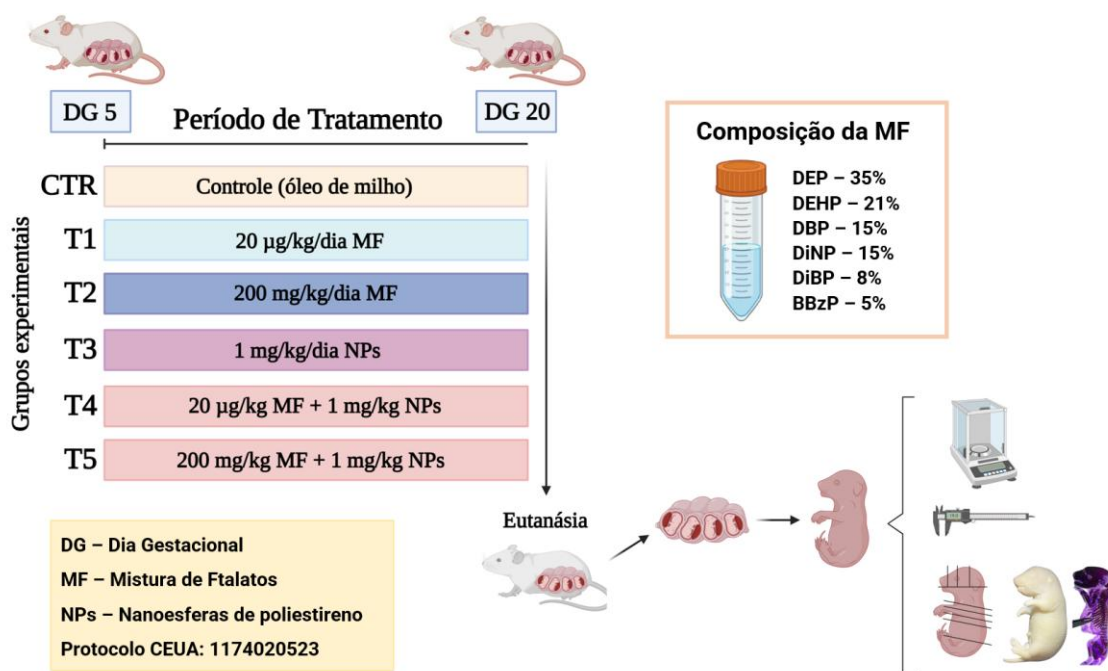


Figura 14: Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas e a composição da mistura de ftalatos (MF). O tratamento foi do dia gestacional 5 (DG5) até o DG20, por via oral. As ratas prenhes foram divididas em 6 grupos experimentais, grupo controle (C): recebeu óleo de milho/água (veículo), T1: recebeu 20µg/kg/dia da MF, T2: recebeu 200mg/kg/dia da MF, T3: recebeu 1mg/kg/dia de nanosferas de poliestireno (NPs) 100 nm, T4: recebeu 20µg/kg/dia + 1mg/kg/dia de NPs, e T5: recebeu 200mg/kg/dia + 1mg/kg/dia de NPs. Ao final do período gestacional (DG20), as ratas foram eutanasiadas e os fetos isolados, pesados, e medidos com paquímetro digital as distâncias crânio-caudal, encefálica e anogenital, e em seguida, foram colocados em fixadores para posterior análises viscerais e esqueléticas.

3.2 Avaliação do desenvolvimento fetal

Todos os fetos foram removidos individualmente e suas placentas foram analisadas. O número de fetos vivos foi determinado e, em seguida, foram classificados individualmente de acordo com os valores médios dos pesos do grupo controle (CTR) como: pequeno para a idade de prenhez (PIP) quando o peso for inferior à média CTR (- 1,0 desvio padrão, DP); apropriado para a idade de prenhez (AIP) quando peso for incluído na média CTR ($\pm$ 1,0 DP); e grande para idade de prenhez (GIP) quando o peso for superior à média CTR (+ 1,0 DP) (da Cruz et al., 2023), o valor corrigido do desvio padrão foi calculado a partir do percentil 90 da clínica e encaixado para o delineamento experimental deste estudo.

Todos os fetos foram avaliados sob um estereomicroscópio, de acordo com sua morfologia

externa, detectando anomalias, como implantação de orelha, estrutura ocular, estrutura craniana, sangramento interno, tamanho dos membros, fechamento do tubo neural e assim por diante (Manson; Kang, 1994). Os fetos também foram medidos, com paquímetro digital, em relação à distância craniocaudal (comprimento do corpo, da ponta do nariz até a parte escamosa da cauda), as dimensões encefálicas (medida pela distância entre a abertura do conduto auditivo), e a distância anogenital (DAG - do tubérculo genital ao ânus). Como a DAG pode ser influenciada por outros fatores que não sejam o tratamento pelo agente exógeno (Gallavan et al., 1999), sua medição foi normalizada para evitá-los, sendo medida pela razão entre a DAG (mm) e a raiz cúbica da massa corporal (g).

3.3 Parâmetros viscerais

Para preservar sua integridade para análises futuras, os fetos escolhidos foram colocados em uma placa de gelo, em seguida foram feitas avaliações na morfologia externa. Depois os fetos foram imersos em solução Davidson para fixação por 24 horas. Em seguida a solução foi trocada por álcool 80% por 48 horas, e álcool 90% por mais 48 horas até o momento da análise. O objetivo foi aplicar o plano de corte de Wilson (Wilson, 1965) na cabeça dos fetos, com cortes transversais e longitudinais, bem como os planos propostos por Barrow e Taylor (Barrow; Taylor, 1969) no tórax, que envolvem cortes transversais e longitudinais. Esses cortes serão realizados para avaliar possíveis anomalias viscerais em tecidos como: ventrículos cerebrais, córnea, retina, cavidade nasal, palato, glândula salivar, tireoide, esôfago, traqueia, coração, timo, fígado, rins, bexiga, ureteres, gônadas.

3.4 Parâmetros esqueléticos

Para a realização desta análise, os fetos foram submersos em solução de álcool 100% por 24 horas. Em seguida, a solução foi substituída por uma de KOH 0,8% e adicionada uma solução saturada de Alizarin Red. Essa solução foi trocada seis vezes, com um intervalo mínimo de 24 horas entre cada troca, seguindo os procedimentos propostos por Staples e Schnell (Staples; Schnell, 1954). Os parâmetros utilizados foram os estabelecidos por Aliverti e colaboradores (Aliverti et al., 1979).

3.5 Análise Estatística

Nas análises estatísticas, a unidade experimental foi a ninhada. Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ DP ou mediana, seguido do intervalo interquartil q1-q3. Para os dados

quantitativos e morfométricos foi utilizado o ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Para os dados oriundos de análise de peso fetal, esquelética e visceral dos fetos foi utilizada uma tabela de contingência, e os dados foram comparados utilizando o teste exato de Fisher. A diferença estatística foi considerada significativa quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$. Para essas análises foi utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros embrionários

Em relação aos parâmetros fetais como números de fetos vivos e as distâncias encefálica e crânio-caudal não foram observadas diferenças significativas nos grupos de tratamento (Tabela 3). O peso placentário da prole masculina reduziu no grupo T3 em relação ao CTR, consequentemente, a relação do peso fetal sobre placentário, a eficiência placentária aumentou nesse mesmo grupo (Tabela 3). A classificação do peso dos fetos mostrou, no grupo T3 em relação ao CTR, uma redução no número de fetos classificados como adequados para idade de prenhez (AIP) (Figura 15), e um aumento de número de fetos nascidos como pequenos para idade de prenhez (PIP, $p = 0,06$). Além disso, o grupo T5 mostrou um aumento de fetos nascidos como PIP quando $p = 0,07$ (Figura 15). Outro parâmetro importante é a distância anogenital relativa, a qual foi mensurada e mostrou uma redução nos grupos T1, na prole feminina, e T2 na prole masculina quando comparados ao CTR (Figura 16a, b).

	Grupos experimentais					
Parâmetros	CTR	T1	T2	T3	T4	T5
N ° Fetos Vivos	12,83 ± 2,14	12,00 ± 1,91	13,83 ± 1,33	10,86 ± 4,06	12,00 ± 5,24	12,29 ± 6,26
Proporção sexual de fetos vivos totais(masculino/feminino)	42/32	44/40	35/48	34/42	32/28	41/45
Peso Fetal (Fêmeas) (g)	4,062 ± 0,19	3,951 ± 0,28	4,003 ± 0,15	3,952 ± 0,47	3,995 ± 0,19	3,931 ± 0,36
Peso Fetal (Machos) (g)	4,141 ± 0,26	4,125 ± 0,27	4,278 ± 0,23	4,153 ± 0,37	4,036 ± 0,22	4,050 ± 0,59

Eficiência Placentária (Machos)	6,51 ± 0,51	6,73 ± 0,43	6,78 ± 0,83	7,34 ± 1,60*	6,82 ± 0,78	6,45 ± 1,43
Distância Encefálica (Fêmeas) (mm)	10,11 ± 0,34	10,11 ± 0,19	9,792 ± 0,64	10,29 ± 0,32	10,10 ± 0,15	9,847 ± 0,36
Distância Encefálica (Machos) (mm)	10,16 ± 0,40	10,34 ± 0,32	10,01 ± 0,52	10,25 ± 0,23	10,24 ± 0,36	10,25 ± 0,58
Distância Crânio-caudal (Fêmeas) (mm)	53,95 ± 1,47	53,63 ± 1,99	53,79 ± 4,12	54,04 ± 2,56	54,05 ± 1,80	53,89 ± 2,47
Distância Crânio-caudal (Machos) (mm)	54,64 ± 0,91	55,24 ± 1,69	55,48 ± 3,74	55,00 ± 1,56	55,64 ± 1,70	54,92 ± 3,99

Tabela 3: Parâmetros embriofetais por ninhada. Valores expressos média ± DP; teste ANOVA, seguido de Tukey; e significativo quando *p<0,05 comparado ao CTR.

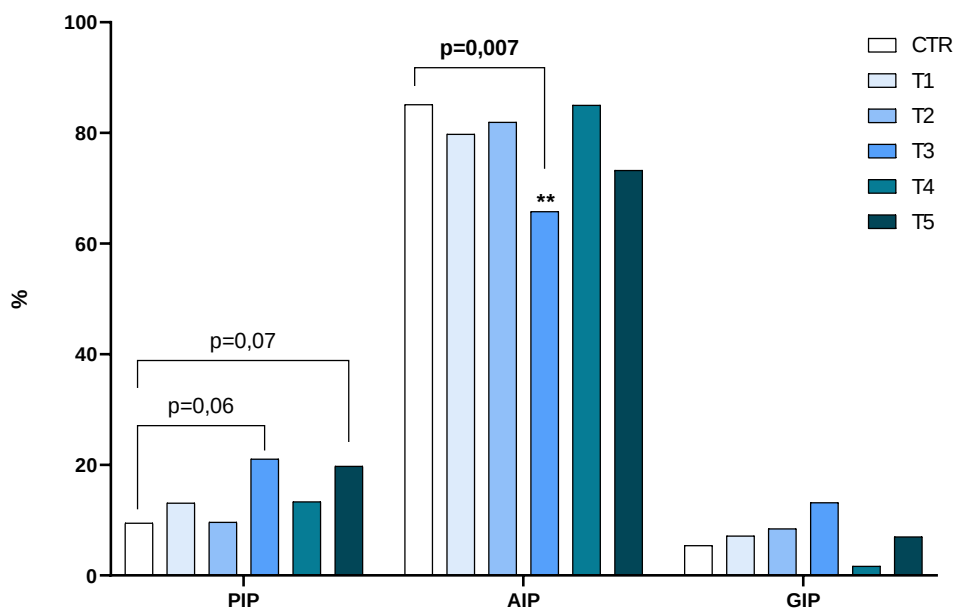


Figura 15: Gráfico representativo da distribuição do peso dos fetos (%) de acordo com a idade gestacional de fêmeas tratadas nos diferentes grupos. Teste de Fisher, significativo quando **p<0,01 comparado ao CTR. PIP – pequeno para idade de prenhez; AIP – adequado para idade de prenhez; GIP – grande para idade de prenhez.

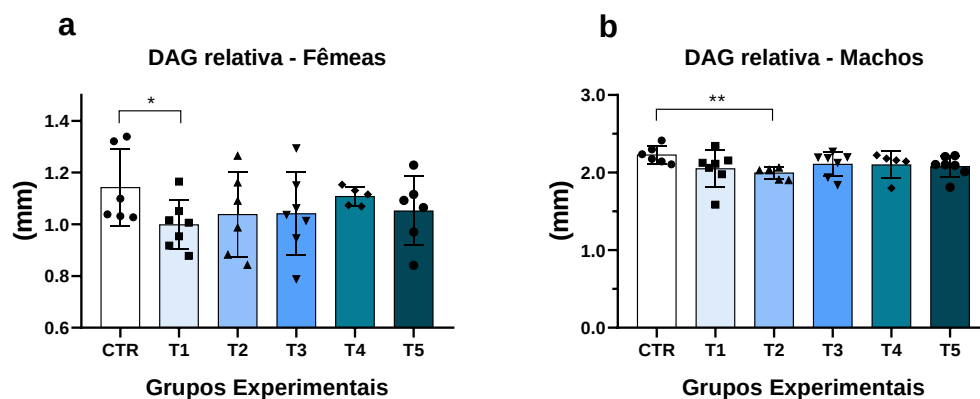
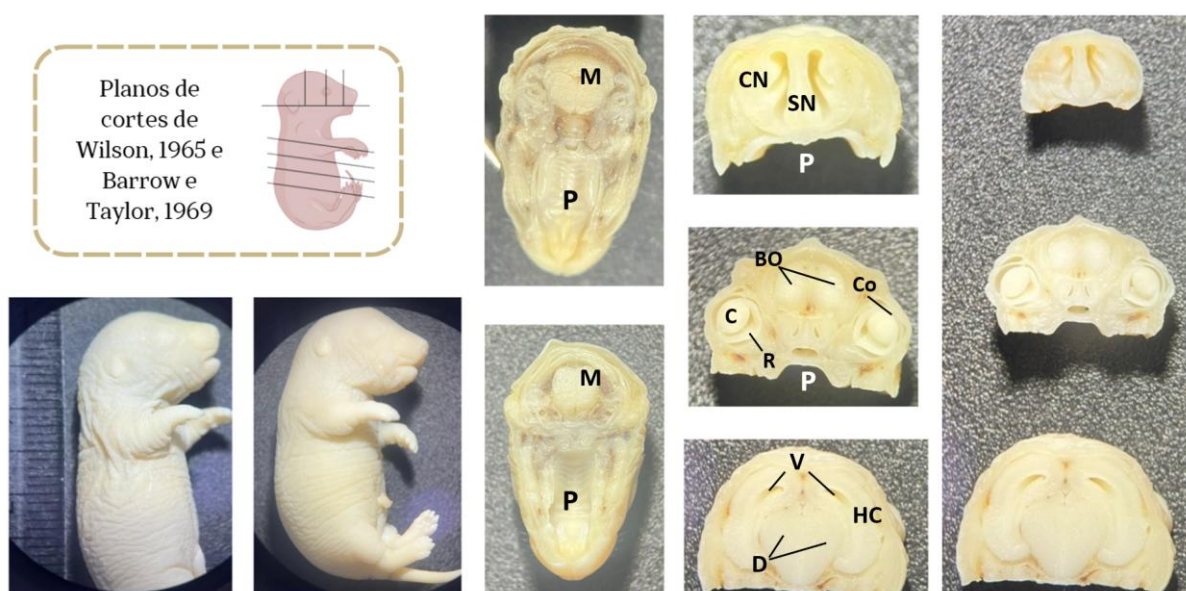


Figura 16: Gráficos representativos das DAGs relativas (distância anogenital (mm) dividida pela raiz cúbica da massa corporal (g)) da prole feminina (a) e masculina (b) nos diferentes grupos experimentais. Valores expressos pela média $\pm$ DP; teste ANOVA, seguido de Tukey. O asterisco significa diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR quando $*p < 0,05$ ou $**p < 0,01$.

4.2 Parâmetros viscerais e esqueléticos

Considerando a limitação deste estudo que é o número amostral reduzido para avaliações fetais viscerais e esqueléticas, aqui não foi observado nenhuma diferença significativa das proles femininas e masculinas nos grupos expostos em relação ao grupo CTR. Abaixo estão as fotos dos fetos do grupo controle, da prole feminina (Figura 17 e 19) e prole masculina (Figura 18 e 20) nas análises viscerais e esqueléticas realizadas.



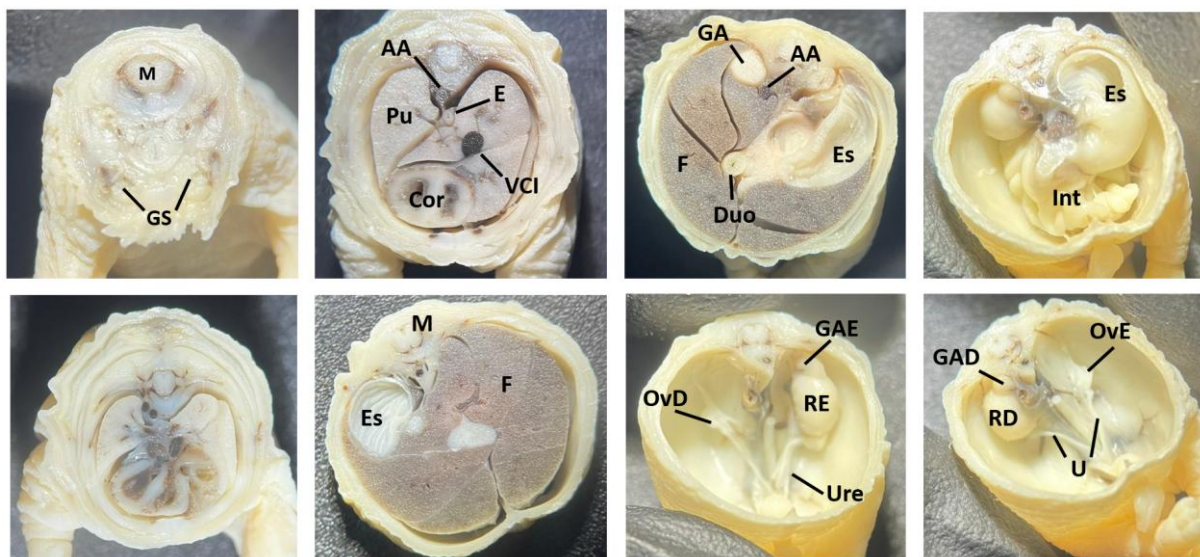


Figura 17: Fotomicrografias de fetos de prole feminina coletados no DG20 para análise visceral e fixados em álcool absoluto, evidenciando os planos de cortes de acordo com Wilson 1965 e Barrow e Taylor 1969. Órgãos representados e destacados: M, medula; P, palato; SN, septo nasal; CN, cavidade nasal; BO, bulbo olfatório; C, cristalino; Co, córnea; R, retina; V, ventrículo; HC, hemisfério cerebral; D, diencéfalo; GS, glândula salivar; AA, artéria aorta; Pu, pulmão; E, esôfago; Cor, coração; VCI, veia cava inferior; GA, glândula adrenal; F, fígado; Duo, duodeno; Es, estômago; GAE, glândula adrenal esquerda; RE, rim esquerdo; OvD, ovário direito; Ure, ureter; GAD, glândula adrenal direita; RD, rim direito; OvE, ovário esquerdo; U, útero.

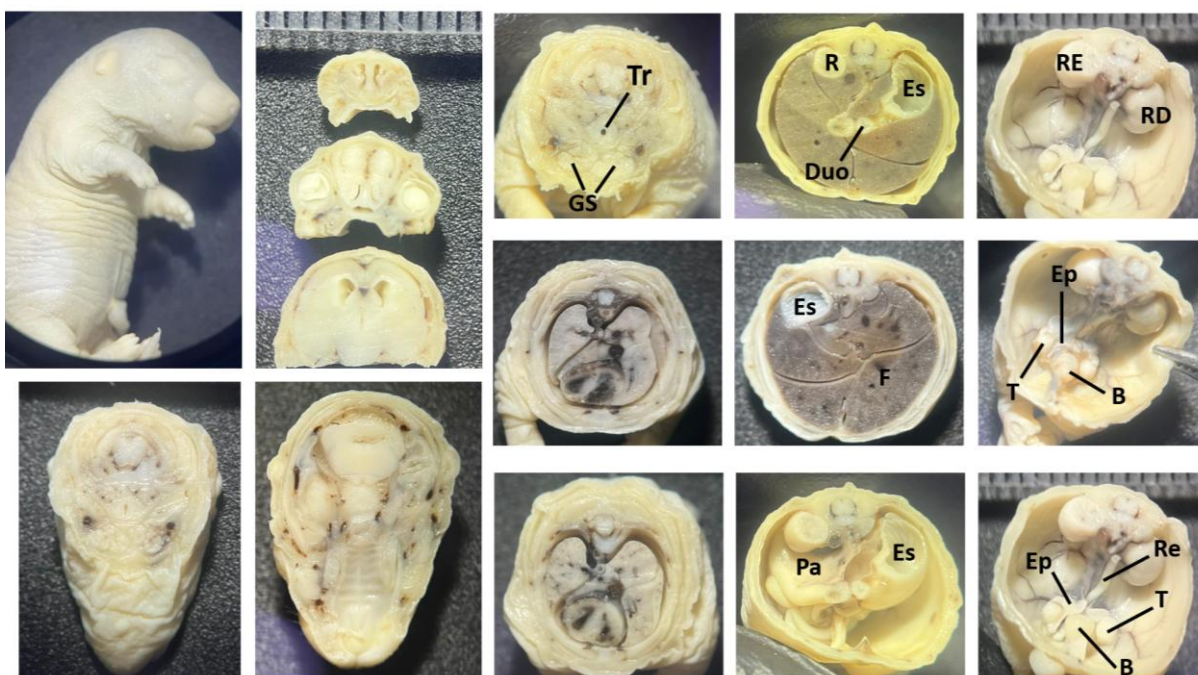


Figura 18: Fotomicrografias de fetos de prole masculina coletados no DG20 para análise visceral e fixados em álcool absoluto, evidenciando os órgãos viscerais. Órgãos representados e destacados como nas fotos das fêmeas. Tr, traqueia; GS, glândula salivar; R, rim; Es, estômago; F, fígado; Duo, duodeno; RE, rim esquerdo; RD, rim direito; Pa, pâncreas; Ep, epidídimo; Re, reto; T, testículo; B, bexiga.

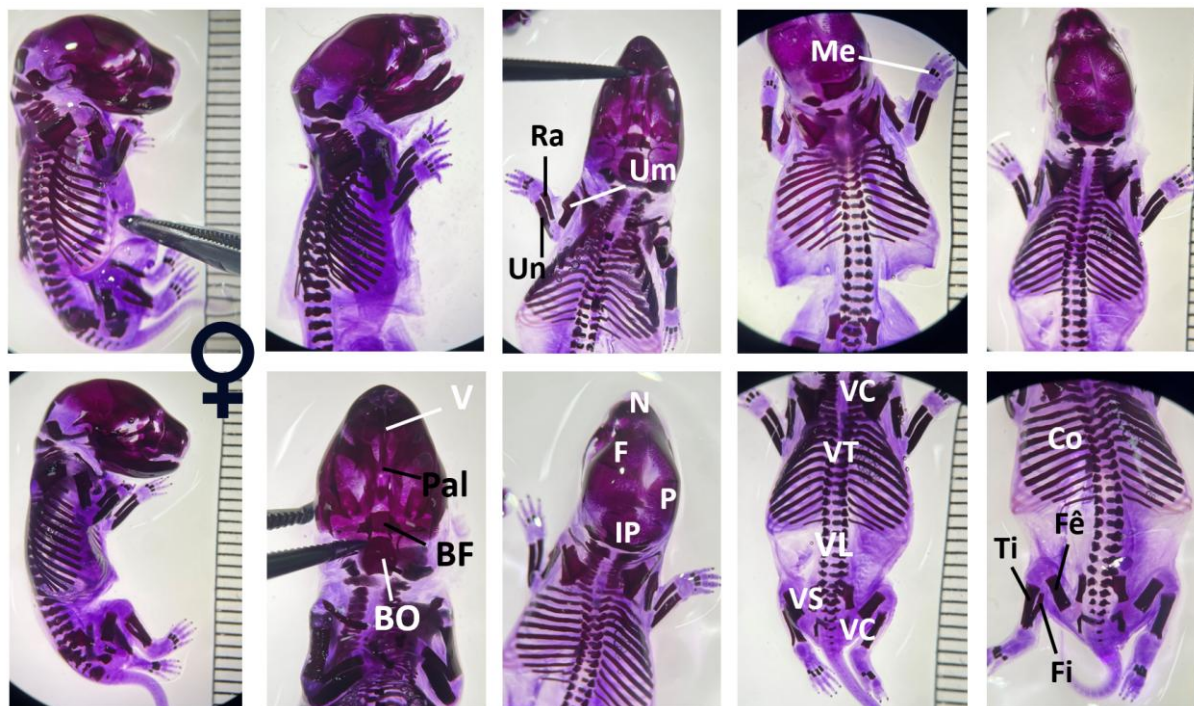


Figura 19: Fotomicrografias de fetos de prole feminina coletados no DG20 e fixados em Alizarina Red para análise esquelética. Órgãos representados e destacados, Ra, rádio; Um, Ulna; Um, úmero; Me, metacarpos; V, volmer; Pal, palato; BF, basisfenoide; BO, basoccipital; N, nasal; F, frontal; P, parietal; IP, interparietal; VC, vértebras cervicais; VT, vértebras torácicas; VL, vértebras lombares; VS, vértebras sacrais; VC, vértebras caudais; Co, costelas; Fê, fêmur; Ti, tíbia; Fi, fíbula.

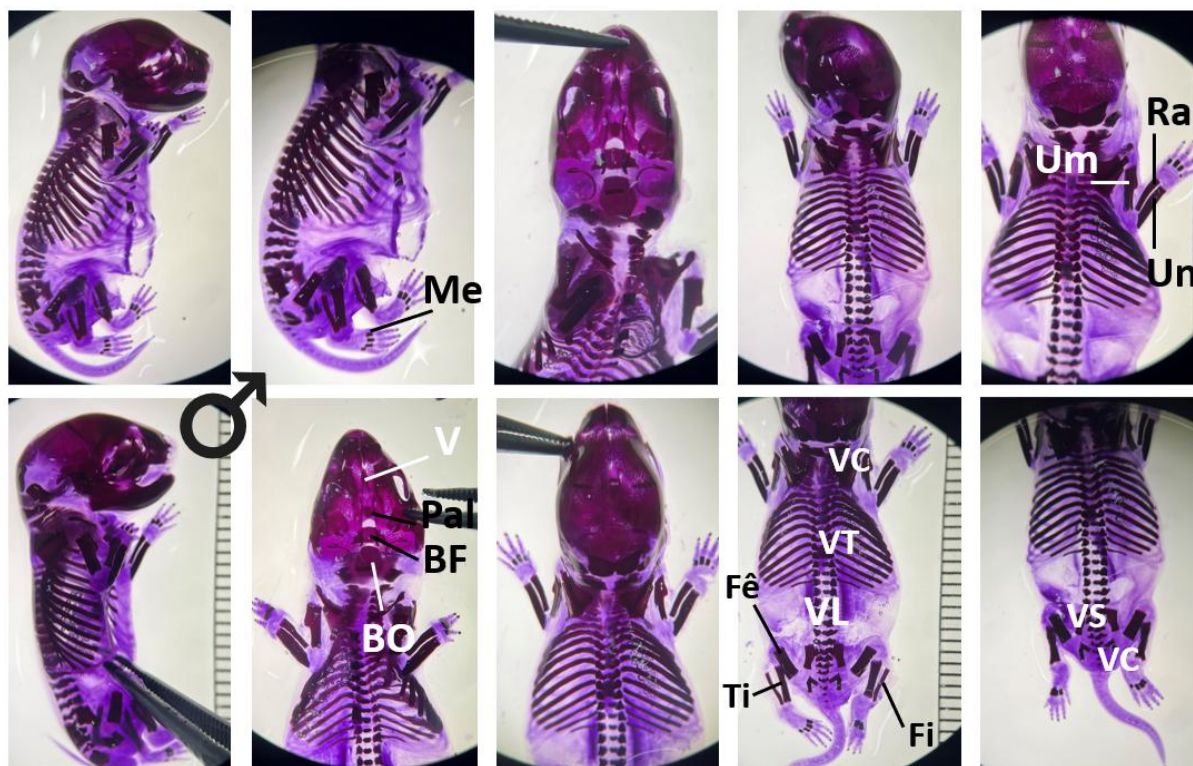


Figura 20: Fotomicrografias de fetos de prole masculina coletados no DG20 e fixados em Alizarina Red para análise esquelética como nas fotos das fêmeas. Órgãos representados e destacados, Me, metatarsos; Ra, rádio; Um, Ulna; Um, úmero; V, volmer; Pal, palato; BF, basisfenoide; BO, basoccipital; VC, vértebras cervicais; VT, vértebras torácicas; VL, vértebras lombares; VS, vértebras sacrais; VC, vértebras caudais; Fê, fêmur; Ti, tíbia; Fi, fíbula.

vértebras torácicas; VL, vértebras lombares; VS, vértebras sacrais; VC; vértebras caudais; Co, costelas; Fê, fêmur; Ti, tíbia; Fi, fíbula.

5. DISCUSSÃO

Os primeiros mil dias de vida de um indivíduo, compreendendo desde o período intrauterino até os dois anos de vida, é uma janela crítica do desenvolvimento, capaz de modular a suscetibilidade ao surgimento de doenças mais tarde na vida, um conceito atrelado à hipótese DOHaD (Barker; Osmond, 1986; Barker, 1990). Nesse sentido, fatores ambientais e nutricionais, neste período, podem ter consequências permanentes e se manifestar ao longo da vida, tanto do bebê, quanto da mãe (Gómez-Roig et al., 2021; Liu et al., 2024). Dessa forma, a relação materno-fetal, definida pela placenta, é essencial para moldar as respostas diante de possíveis agravos ambientais, como a exposição aos plásticos e seus aditivos. Aqui, observamos impactos sobre o desenvolvimento fetal, como a diminuição de fetos adequados para idade de prenhez (AIP) no grupo T3, o aumento de fetos pequenos para a idade gestacional (PIP) nos grupos T3 e T5 e a redução na distância anogenital (DAG) em fêmeas no grupo T1 e em machos no grupo T2.

Apesar dos pesos fetais absolutos não apresentarem alterações significativas, no grupo T3 houve uma redução nos fetos classificados como adequados para idade de prenhez (AIG) em relação ao CTR. Esse dado pode ser resultado do desbalanço entre o peso fetal e placentário. Mesmo que haja um aumento na eficiência placentária, por ser um dado relativo, essa mudança não foi suficiente para suportar o crescimento adequado do feto, resultando na redução de nascidos AIP. O tamanho ao nascer é uma medida importante do crescimento fetal e os fetos são mais vulneráveis a exposição plástica do que as mães devido a sua imaturidade metabólica (Reynolds et al., 2019; Möllers et al., 2022). De acordo com a hipótese DOHaD, o baixo peso ao nascer pode acarretar em consequências a longo prazo na vida desse indivíduo, como risco aumentado de doenças crônicas – cardiovasculares e metabólicas – e problemas no neurodesenvolvimento (Grigorenko, 2017; Kumaran; Osmond; Fall, 2017). Na última década, muitos estudos avaliaram a associação entre a exposição aos ftalatos e o baixo peso ao nascer em humanos (Botton et al., 2016; Yu et al., 2024). Dados recentes com camundongos apontaram um aumento na restrição do crescimento fetal após a exposição materna a micro e nanoplásticos oferecidos na água, com concentrações de 10mg e 1mg e tamanhos variando entre 50nm ou 10nm, o que pode ter relação ao fato de partículas pequenas se acumularem com mais facilidade em tecidos e aumentar a toxicidade (Aghaei et al., 2022; Chen et al., 2023). Em um

estudo utilizando camundongos prenhes foi observado redução do peso fetal e da distância anogenital sexo independente após a exposição ao DEHP (50 ou 200mg/kg) durante a gestação (Shen et al., 2017). A grande variação entre os delineamentos experimentais dificulta a afirmação da associação positiva entre a exposição aos resíduos plásticos e o baixo peso ao nascer, se fazendo necessário mais estudos que forneçam resultados sistemáticos sobre a relação entre esses dois parâmetros (Shoaff et al., 2016; Yu et al., 2024).

Um dos efeitos mais efetivos da exposição aos DEs, especialmente aos ftalatos, é a redução da distância anogenital (DAG), tanto em humanos quanto em roedores, pois ela é um dos pontos finais mais sensíveis da exposição pré-natal aos ftalatos (Zarean et al., 2019; Kahn et al., 2020). No presente estudo, a DAG absoluta foi normalizada para garantir a consistência dos dados, e observamos que a razão DAG–peso corporal ^{1/3} de fetos femininos reduziram no grupo T1, e de fetos masculinos no grupo T2, ambos expostos apenas com a mistura de ftalatos. A DAG é um parâmetro que reflete a presença dos andrógenos na diferenciação sexual, especialmente em machos, e esses resultados podem demonstrar a ação antiandrogênica clássica dos ftalatos no desenvolvimento do sistema genital. Muitos estudos demonstraram que vários tipos de ftalatos como DEHP e DBP reduziram a distância anogenital de machos e alteraram a histologia testicular (Gray et al., 2000; Andrade et al., 2006; Radke et al., 2018), observando efeitos mais evidentes em ninhadas masculinas. Além disso, a exposição a desreguladores endócrinos tem sido associada à síndrome da disgenesia testicular, condições que afetam a produção normal de andrógenos e tem consequências na saúde reprodutiva masculina, e a redução da DAG pode ser um indício dessa síndrome (Fisher, 2004; Mahood et al., 2005). Já em proles femininas, os efeitos observados, tanto de exposição a ftalatos quanto de nanoplásticos, são infertilidade, interrupção do crescimento e atresia de folículos, desregulação da homeostasia de hormônios sexuais, fibrose ovariana e aumento de estresse oxidativo (Panagiotou; Ojasalo; Damdimopoulou, 2021; Wu et al., 2023). Ademais, em um estudo foi relatado que a DAG na prole feminina diminuiu, de uma forma não dependente da dose, em todos os grupos de tratamento após exposição gestacional de di-n-hexil ftalato (DHP) ou diciclohexil ftalato (DCHP) (20, 100 ou 500mg/kg/dia) (Ahbab et al., 2017). A partir desses resultados, podemos aferir que a exposição gestacional a mistura de ftalatos foi capaz de alterar parâmetros de diferenciação sexual tanto da prole masculina quanto feminina, ao reduzir a DAG. No entanto, o mecanismo que reduz essa distância em machos e fêmeas pode ser distinto, visto que em fêmeas, a ausência da testosterona é fator condicional para a diferenciação sexual da genitália externa.

6. REFERÊNCIAS

- AGHAEI, Z. et al. Maternal Exposure to Polystyrene Micro- and Nanoplastics Causes Fetal Growth Restriction in Mice. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 9, n. 5, p. 426–430, 10 maio 2022.
- AHBAB, M. A. et al. Comparative developmental toxicity evaluation of di-n-hexyl phthalate and dicyclohexyl phthalate in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 33, n. 9, p. 696–716, 31 ago. 2017.
- ALIVERTI, V. et al. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v. 20, n. 2, p. 237–242, 1979.
- ANDRADE, A. J. M. et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. **Toxicology**, v. 225, n. 1, p. 64–74, 1 ago. 2006.
- BARKER, D. J. P. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ: British Medical Journal**, v. 301, n. 6761, p. 1111, 11 nov. 1990.
- BARKER, D. J. P.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8489, p. 1077–1081, 10 maio 1986.
- BARROW, M. V.; TAYLOR, W. J. A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. **Journal of morphology**, v. 127, n. 3, p. 291–305, 1969.
- BOTTON, J. et al. Phthalate pregnancy exposure and male offspring growth from the intra-uterine period to five years of age. **Environmental research**, v. 151, p. 601–609, 1 nov. 2016.
- CARY, C. M. et al. Ingested Polystyrene Nanospheres Translocate to Placenta and Fetal Tissues in Pregnant Rats: Potential Health Implications. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 4, 1 fev. 2023.
- CHEN, H. et al. Exposure to dipentyl phthalate in utero disrupts the adrenal cortex function of adult male rats by inhibiting SIRT1/PGC-1 α and inducing AMPK phosphorylation. **Environmental toxicology**, v. 38, n. 5, p. 997–1010, 1 maio 2023.
- CHOUDHARY, D. et al. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 414, n. 1, p. 91–100, 1 jun. 2003.
- DA CRUZ, L. L. et al. Severe Diabetes Induction as a Generational Model for Growth Restriction of Rat. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 30, n. 8, p. 2416–2428, 1 ago. 2023.
- FISHER, J. S. Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 127, n. 3, p. 305–315, 2004.
- GALLAVAN, R. H. et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1 set. 1999.
- GÓMEZ-ROIG, M. D. et al. Environmental Exposure during Pregnancy: Influence on Prenatal Development and Early Life: A Comprehensive Review. **Fetal diagnosis and therapy**, v. 48, n. 4, p. 245–257, 1 abr. 2021.

GRAY, L. E. et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 58, n. 2, p. 350–365, 2000.

GRIGORENKO, E. L. Brain Development: The Effect of Interventions on Children and Adolescents. **Disease Control Priorities**, Third Edition (Volume 8): Child and Adolescent Health and Development, p. 119–132, 20 nov. 2017.

HIRKE, A. et al. Exposure to endocrine-disrupting chemicals and risk of gestational hypertension and preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. **Environmental pollution** (Barking, Essex: 1987), v. 317, 15 jan. 2023.

KAHN, L. G. et al. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, v. 8, n. 8, p. 703–718, 1 ago. 2020.

KUMARAN, K.; OSMOND, C.; FALL, C. H. D. Early Origins of Cardiometabolic Disease. **Disease Control Priorities**, Third Edition (Volume 5): Cardiovascular, Respiratory, and Related Disorders, p. 37–55, 17 nov. 2017.

LAPEHN, S.; PAQUETTE, A. G. The Placental Epigenome as a Molecular Link Between Prenatal Exposures and Fetal Health Outcomes Through the DOHaD Hypothesis. **Current environmental health reports**, v. 9, n. 3, p. 490–501, 1 set. 2022.

LIU, B. et al. Influence of maternal endocrine disrupting chemicals exposure on adverse pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 270, 15 jan. 2024.

MAHOOD, I. K. et al. Abnormal Leydig Cell Aggregation in the Fetal Testis of Rats Exposed to Di (n-Butyl) Phthalate and Its Possible Role in Testicular Dysgenesis. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 613–623, 1 fev. 2005.

MANSON, J.N., KANG, Y.J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW, ed. **Principles and Methods of Toxicology**. New York: Raven Press; 1994:989-1037.

MÖLLERS, L. S. et al. Metabolic-endocrine disruption due to preterm birth impacts growth, body composition, and neonatal outcome. **Pediatric research**, v. 91, n. 6, p. 1350–1360, 1 maio 2022.

MORENO, G. M. et al. Identification of micro- and nanoplastic particles in postnatal sprague-dawley rat offspring after maternal inhalation exposure throughout gestation. **The Science of the total environment**, v. 951, 15 nov. 2024.

PANAGIOTOU, E. M.; OJASALO, V.; DAMDIMOPOULOU, P. Phthalates, ovarian function and fertility in adulthood. Best practice & research. **Clinical endocrinology & metabolism**, v. 35, n. 5, 1 set. 2021.

RADHA, M.; BASHA, M. P. In Utero Exposure to Di-n-butyl Phthalate Causes Modulation in Neurotransmitter System of Wistar Rats: A Multigenerational Assessment. **International journal of toxicology**, v. 43, n. 6, p. 579–589, 12 dez. 2024.

RADKE, E. G. et al. Phthalate exposure and male reproductive outcomes: A systematic review of the human epidemiological evidence. **Environment international**, v. 121, n. Pt 1, p. 764–793, 1 dez. 2018.

- REYNOLDS, L. P. et al. Developmental Programming of Fetal Growth and Development. **The Veterinary clinics of North America**. Food animal practice, v. 35, n. 2, p. 229–247, 1 jul. 2019.
- SCARANO, W. R. et al. IMPACT OF REAL-LIFE ENVIRONMENTAL EXPOSURES ON REPRODUCTION: Phthalate exposure and reproductive effects in rodents: a model for approaches on the protective role of natural products. **Reproduction** (Cambridge, England), v. 169, n. 1, 1 nov. 2025.
- SHEN, R. et al. Maternal di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure during pregnancy causes fetal growth restriction in a stage-specific but gender-independent manner. **Reproductive toxicology** (Elmsford, N.Y.), v. 67, p. 117–124, 1 jan. 2017.
- SHOAFF, J. R. et al. Prenatal phthalate exposure and infant size at birth and gestational duration. **Environmental research**, v. 150, p. 52–58, 1 out. 2016.
- STAPLES, R. E.; SCHNELL, V. L. REFINEMENTS IN RAPID CLEARING TECHNIC IN THE KOH-ALIZARIN RED S METHOD FOR FETAL BONE. **Stain technology**, v. 39, jan. 1954.
- TACHIBANA, M.; NAKAYAMA, M.; MIYOSHI, Y. Placental examination: prognosis after delivery of the growth-restricted fetus. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v. 28, n. 2, p. 95–100, 1 abr. 2016.
- WILSON, J. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. **Teratology**, p. 262–277, 15 mar. 1965.
- WU, H. et al. Polystyrene-microplastics and DEHP co-exposure induced DNA damage, cell cycle arrest and necroptosis of ovarian granulosa cells in mice by promoting ROS production. **The Science of the total environment**, v. 871, 1 maio 2023.
- YU, Y. et al. Prenatal phthalate exposure and birth size: a systematic review and meta-analysis. **International journal of environmental health research**, v. 34, n. 7, p. 2813–2829, 2024.
- ZAREAN, M. et al. The role of exposure to phthalates in variations of anogenital distance: A systematic review and meta-analysis. **Environmental pollution** (Barking, Essex: 1987), v. 247, p. 172–179, 1 abr. 2019.
- ZHANG, X.; HO, S. M. Epigenetics meets endocrinology. **Journal of molecular endocrinology**, v. 46, n. 1, p. R11, fev. 2011.
- ZHOU, C.; GAO, L.; FLAWS, J. A. Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 318, p. 49–57, 1 mar. 2017.
- ZURUB, R. E. et al. Microplastics exposure: implications for human fertility, pregnancy and child health. **Frontiers in endocrinology**, v. 14, 2024.

CAPÍTULO 4: ANÁLISE DO MICROBIOMA INTESTINAL MATERNO E FETAL

Impactos na composição do microbioma de ratos após a exposição gestacional e lactacional aos ftalatos e nanoplásticos

Natália Magosso¹, Patrick Vieira de Souza¹, Mirella Franco Moreira¹, Vanessa Aguiar Rocha¹, Matheus Naia Fioretto¹; Felipe Cristiano Barbosa¹, Isabella Fávaro¹, Victória Cristina Pinha¹, Gabriel Aquino de Souza Maia¹, Vinícius Luís Rocha da Silva Maria², Josias Rodrigues³, Wellerson Rodrigo Scarano¹

¹ Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, São Paulo, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, UNESP, Bauru, SP, Brasil.

³ Departamento de Química e Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, São Paulo, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal, comunidade de microrganismos, possui funções essenciais para manutenção fisiológica do corpo humano (Hills et al., 2019; Stinson, 2020). Desde a descoberta do microbioma, estudos experimentais em modelos animais forneceram informações sobre as causas e consequências de alterações no ambiente intestinal. Dentre elas, fatores que podem regular a microbiota são os padrões de estilo de vida e dieta, produtos químicos, medicamentos, poluentes ambientais, entre outros (García-Montero et al., 2021; Arifuzzaman et al., 2024). Esses poluentes, como os ftalatos e nanoplásticos, possuem potencial para alterar a composição e a funcionalidade da microbiota intestinal, contribuindo para a disbiose (Chiu et al., 2020; Tilves et al., 2023). A disbiose é associada à uma série de doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, doença inflamatória intestinal (DII), diabetes tipo 2 (DM2), síndrome

metabólica (SM), doença cardiovascular (DCV), doenças autoimunes e até câncer colorretal (Hills et al., 2019; Vijay; Valdes, 2022).

O microbioma humano, que se desenvolve gradualmente ao longo dos primeiros 1000 dias de vida, é dinâmico e altamente suscetível aos fatores ambientais, que, por sua vez, podem levar ao desenvolvimento de doenças crônicas (Stinson, 2020). Dessa forma, insultos maternos como a exposição perinatal a substâncias que atuam como desreguladores endócrinos podem desequilibrar a microbiota intestinal da mãe e consequentemente do filho, levando a uma menor diversidade de espécies na comunidade microbiana (Chiu et al., 2020; Shum et al., 2023). Por isso, a microbiota se adapta e muda continuamente ao longo de toda a vida, garantindo a manutenção da eubiose.

Um estudo demonstrou a toxicidade de MNPs em peixes, roedores e em células humanas. Os principais efeitos observados, após a exposição em diferentes idades e concentrações, foram disbiose intestinal, disfunção da barreira intestinal, alterações no metabolismo, aumento do estresse oxidativo e dos sinais de neurotoxicidade (Yong; Valiyaveetil; Tang, 2020). Evidências recentes relatam que micro e nanoplásticos podem transportar e liberar outros contaminantes, como ésteres de ftalatos (Deng 2020). Deng e colaboradores (2020), usando modelo murino expostos a MPs isolados ou associados aos ftalatos, demonstraram que os MPs adsorvem ftalatos, transportam para o intestino de camundongos e se acumulam. Como resultados observaram um aumento significativo da permeabilidade intestinal e da inflamação intestinal, assim como alteração na composição e abundância das bactérias na análise do sequenciamento do microbioma desses camundongos (Deng 2020). Em outro estudo com modelo experimental de camundongos, Fan e colaboradores (2020) relataram que a exposição pré-natal ao DEHP, em doses baixas (0,2, 2 e 20 mg/kg/dia), resultou em síndrome metabólica e disbiose do microbioma intestinal na prole masculina (Fan et al., 2020).

O fato de que o trato gastrointestinal não só desempenha o papel de digerir e absorver nutrientes, mas também constitui uma das principais áreas de contato entre o organismo e o seu ambiente externo, torna-o ao mesmo tempo essencial para a sobrevivência e vulnerável a potenciais ameaças vindas de fora do corpo. Nesse sentido, sabendo que a dispersão mundial do lixo plástico é uma problemática atual e pode trazer consequências para a saúde da população, nossa hipótese é que a exposição aos nanoplásticos e ftalatos, isolados ou em combinação, pode alterar a composição do microbioma intestinal materno, afetando o equilíbrio e influenciando na saúde fetal, assim como na composição da microbiota de filhos jovens cujas mães foram expostas a estes poluentes.

2. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi investigar a exposição gestacional e lactacional a uma mistura de ftalatos e nanoplásticos (isolados e combinados) sobre a composição do microbioma intestinal tanto das mães, diretamente expostas, quanto de sua prole, avaliando amostras maternas no período gestacional (DG20) e amostras de ratos machos no período pós-desmame (DPN22).

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

A primeira parte deste delineamento foi o mesmo descrito nos Capítulos 2 e 3. Machos adultos da linhagem Sprague Dawley (n=15), com 120 dias de idade (DPN), pesando aproximadamente 300g e fêmeas adultas (n=50), no DPN120, pesando aproximadamente 300g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do IBB/UNESP, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (média de 23-25°C) e receberam água (em garrafas de vidro) e ração para roedores à vontade. Após o período de aclimação dos animais, eles foram separados para o acasalamento, que foi realizado durante o período escuro do ciclo, colocando-se de duas fêmeas na caixa do macho, e o dia zero de prenhez (DG0) foi determinado pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais de fêmeas em estro.

As ratas prenhes foram divididas aleatoriamente em 6 grupos experimentais (n=6-8/grupo): CTR: grupo controle que recebeu o óleo de milho/água; T1: recebeu 20 µg/kg/dia da mistura de ftalatos (MF) diluídos em óleo de milho; T2: recebeu 200 mg/kg/dia da mistura de ftalatos (MF) diluídos em óleo de milho; T3: recebeu nanoesferas de poliestireno (NPs) de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg/dia diluído em água destilada; T4: recebeu 20µg/kg/dia da MF + NPs de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg; e T5: recebeu 200mg/kg/dia da MF+ NPs de 100 nm na concentração de 1,0 mg/kg. Os animais dos grupos T1, T2, T4 e T5 receberam as respectivas doses da mistura de ftalatos na seguinte proporção: 21% DEHP (di-2-etilhexil ftalato), 35% DEP (dietil ftalato), 15% DBP (di-n-butil ftalato), 8% DiBP (diisobutil ftalato), 5% BBzP (butil benzil ftalato), e 15% DiNP (diisononil ftalato). A proporção da mistura se baseia na composição dos principais ftalatos detectados em amostras de urina de mulheres grávidas em Illinois, EUA (Zhou; Gao; Flaws, 2017). Os ftalatos e nanoplástico foram obtidos

da Sigma Aldrich ®: DEHP: 36735, DEP: 524972, DBP: 524980, DiBP: 152641, BBzP: 308501, DiNP: 376663; nanoesferas de poliestireno (nanoplásticos): 43302.

A partir daqui o delineamento segue dois caminhos, **delineamento 1)** as ratas de cada grupo receberam o tratamento, via oral, do dia gestacional 5 (DG5) ao DG20 (Figura 21), ou **delineamento 2)** as ratas de cada grupo receberam o tratamento, via oral, do dia gestacional 10 (DG10) ao dia pós-natal 21 (DPN21), durante a gestação e a lactação (Figura 22). O delineamento 1 foi realizado para análise da microbiota intestinal materna das ratas expostas na gestação após a implantação embrionária, e o delineamento 2 foi desenhado para avaliar a composição da microbiota intestinal dos ratos machos, no DPN22, cujas mães foram tratadas com ftalatos e nanoplásticos durante os períodos gestacional de organogênese e lactacional.

As ratas prenhes no DG20 e os ratos machos recém-desmamados no DPN22 foram anestesiados com uma mistura de xilazina (5mg/kg corpóreo) e cetamina (80mg/kg corpóreo) para coleta dos órgãos de interesse. As fezes das ratas no DG20 e dos ratos machos no DPN22 foram coletadas pela manhã em tubo estéril e congeladas em biofreezer até o momento do estudo do microbiota intestinal. Os dois delineamentos experimentais estão representados na figura 21 e 22. Imagem criada pelo app BioRender.com (Figura 21 e 22).

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (ANEXO 2) (Protocolo: 1174020523).

Delineamento 1:

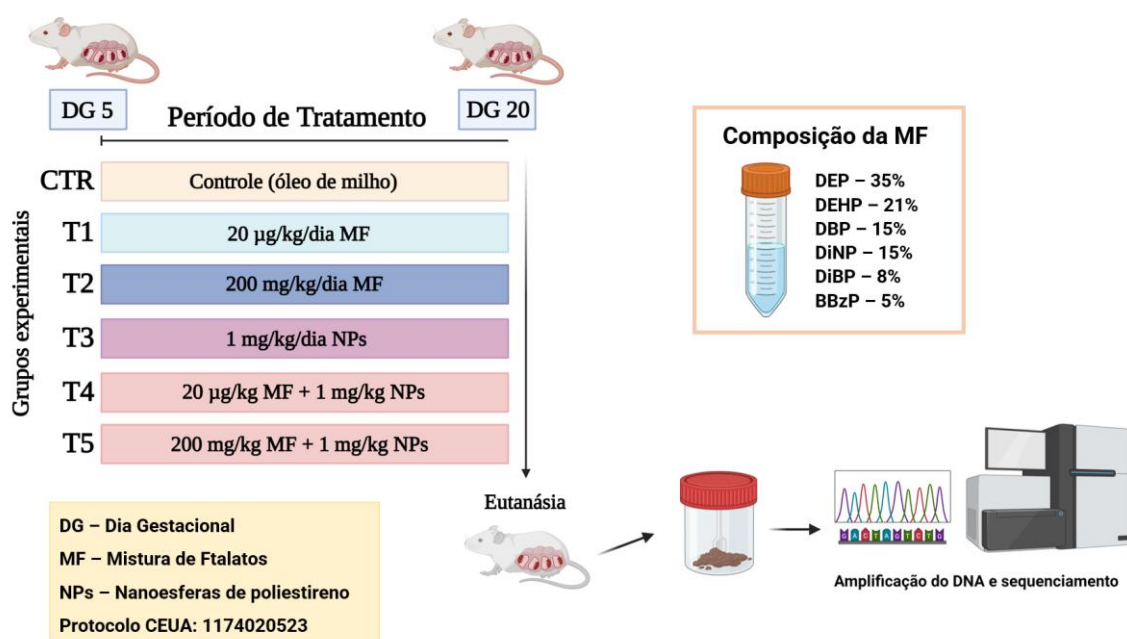


Figura 21: Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas e a composição da mistura de ftalatos (MF). O tratamento foi do dia gestacional 5 (DG5) até o DG20, por via oral. As ratas prenhes foram divididas em 6 grupos experimentais. Ao final do período gestacional (DG20), as ratas foram eutanasiadas e as fezes foram coletadas e armazenadas em tubos estéreis até o momento do processamento das amostras, amplificação do DNA e sequenciamento para análise da composição do microbioma.

Delineamento 2:

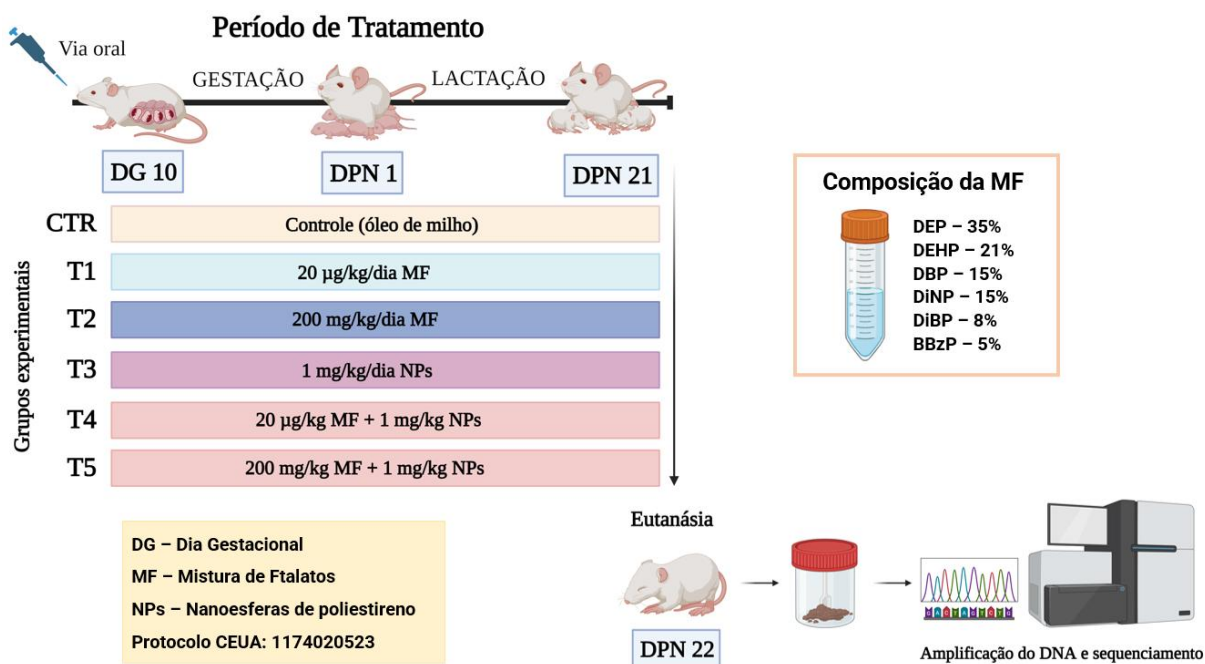


Figura 22: Delineamento experimental representando o tratamento, os grupos experimentais, as doses utilizadas e a composição da mistura de ftalatos (MF). O tratamento foi do dia gestacional 10 (DG10) até o dia pós-natal 21 (DPN21), por via oral. As ratas prenhes foram divididas em 6 grupos experimentais. Ao final do período lactacional (DPN21), os filhotes foram separados das mães e os machos no DPN22 foram eutanasiados e as fezes foram coletadas e armazenadas em tubos estéreis até o momento do processamento das amostras, amplificação do DNA e sequenciamento para análise da composição do microbioma.

3.2 Análise do microbioma intestinal

A análise do microbioma foi realizada com base na identificação de bactérias, em diferentes níveis taxonômicos, a partir do sequenciamento de amplicons da região V6 do gene 16S do RNA ribossômico (16SV6rDNA), utilizando-se como molde o DNA total de cada amostra, extraído de com kits comercialmente disponíveis, conforme descrito a seguir. Essas análises foram realizadas no Setor de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências em colaboração do Prof. Dr. Josias Rodrigues.

3.2.1 PCR e sequenciamento dos amplicons

A PCR para a amplificação do 16SV6rDNA foi realizada conforme o protocolo de Andersson e colaboradores, com modificação na temperatura de anelamento (Andersson et al., 2008). Cada um dos primers foi desenhado com uma sequência adaptadora específica e, no caso

do par reverse, houve a adição de uma sequência barcode de identificação da amostra alvo da amplificação (ver abaixo):

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
1061R_A_Bc	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-NNNNNNNNNN*- GATCRRCACGAGCTGACGAC
784F trP1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGGATTAGATACCCTGGTA

**barcodes*

Ao final da PCR, foi realizada uma eletroforese dos amplicons em gel de agarose (Sigma®) a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA para visualizar se houve amplificação específica utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular. As sequências amplificadas foram purificadas através do sistema de beads magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter®) e quantificadas no aparelho Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen®), com o kit de quantificação Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen®). Em seguida, uma biblioteca numa concentração de 26 pM foi formada contendo concentrações equimolares de cada um dos amplicons. Essa biblioteca foi então submetida a uma PCR em emulsão. Para isto, foi misturada aos primers e demais componentes da PCR juntamente com microesferas (Ion Spheres Particles – ISPs) e óleo. A mistura foi colocada em um termociclador especializado (Ion One Touch™) onde a reação se processou. Ao final, o produto da amplificação foi submetido a um processo de eliminação de resíduos de reagentes e microesferas com falhas na amplificação, de modo que, ao final do processo, se obteve uma alta concentração de microesferas com DNA em condições de ser sequenciado (ISPs enriquecidas). O DNA nas ISPs enriquecidas foi então submetido ao anelamento do primer específico para sequenciamento, e misturado com Taq Dna polymerase, sendo a mistura carregada em um chip 314 v2-BC, que foi introduzido no sequenciador Ion PGM, previamente submetido à inicialização (condicionamento, com ajuste de pH e mistura de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfato) no ambiente de sequenciamento do aparelho). Durante o sequenciamento, o sequenciador esteve ligado a um servidor responsável pelo armazenamento das sequências, geradas na forma de arquivos *.fastq. A metodologia acima descrita está detalhada no manual do fabricante do kit de PCR em emulsão [Torrent, I., Ion PGM Hi-Q TM View OT2 Kit. 2017.] e de sequenciamento [Torrent, I., Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit. 2017.].

3.2.2 Processamento e análise das sequências

A geração dos dados no servidor, conforme mencionado acima, foi acompanhado do processamento das sequências, eliminando erros do tipo quimeras de DNA, primers, barcodes e adaptadores, sendo que ao final, o servidor apresentou um relatório com informações sobre a qualidade e ocorrência do sequenciamento, consistindo em QC20, fragmentação do DNA, tamanho e número de sequências, porcentagem de carregamento do chip e ISPs, etc. Para cada amostra era gerado um arquivo *fastq.

A análise dos dados foi dividida em duas etapas: 1) preparo, organização das sequências e construção da tabela de OTUs e 2) análise e correlações estatísticas com os dados desta tabela. Na primeira etapa, foi feita a separação das sequências de cada amostra e pesquisa na base de dados SILVA (Quast et al., 2013), em busca da identidade de cada OTU, com base nas sequências presentes. Os dados gerados na etapa 2 se basearam na relação de OTUs identificados e que foram agrupados em um arquivo *.csv que, no entanto, apresentava informações distorcidas. Depois de baixar e corrigir suas informações, este arquivo foi utilizado para as seguintes análises estatísticas: cálculo do Índice de Shannon (fórmula demonstrada abaixo) para determinação da diversidade alfa, e teste ANOVA, seguido de Tukey.

Índice de Shannon (H'):

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i * \ln(p_i)$$

Onde: S é o número total de espécies (riqueza); p_i é a proporção de indivíduos da espécie i em relação ao total de indivíduos na comunidade ($p_i = \frac{n_i}{N}$); n_i é o número de indivíduos da espécie i ; e N é o número total de indivíduos de todas as espécies.

3.3 Análise Estatística

Nas análises estatísticas, a unidade experimental foi a ninhada. Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ DP ou mediana, seguido do intervalo interquartil q1-q3. Para os dados quantitativos e morfométricos foi utilizado o ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. A diferença estatística foi considerada significativa quando * $p < 0,05$ ou ** $p < 0,01$. Para essas análises foi utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Análise do microbioma intestinal

Em relação a composição da microbiota materna (DG20), computada pelo número de OTUs de cada amostra, não foi observado diferença estatística a nível de filo (Figura 23). Os gráficos da composição a nível de filo, classe e ordem estão representados na Figura 23a, b e c, respectivamente. Entretanto, na ordem *Bacilli* houve um aumento no grupo T3 em relação ao CTR (Figura 24a). Ainda, observou-se um aumento no grupo T2 na classe *Bacillales* (Figura 24b), e nos grupos T3 e T4 na classe *Lactobacillales* (Figura 24c).

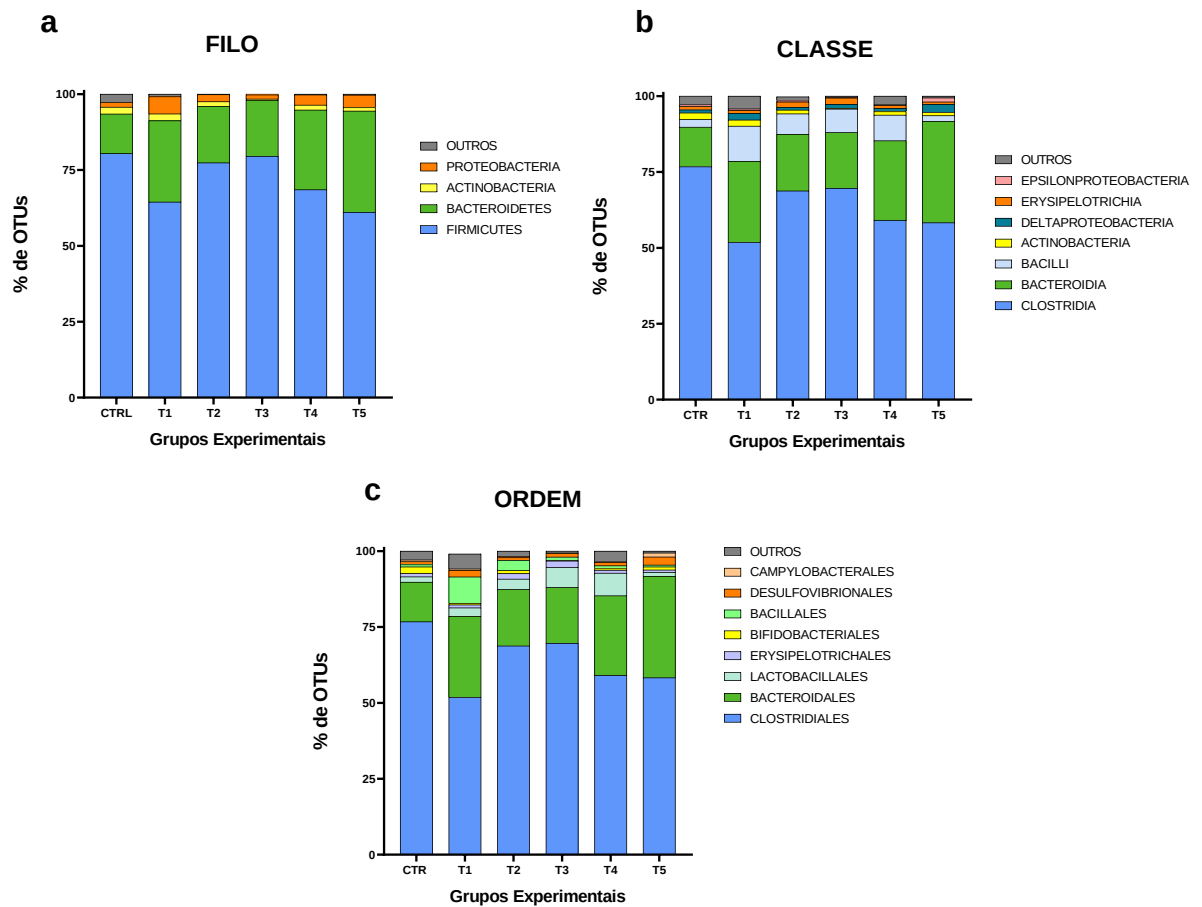


Figura 23: Gráficos representativos da distribuição do microbioma materno cecal, referentes ao delineamento 1, nos níveis de filo (a), classe (b) e ordem (c). Dados apresentados como média $\pm$ DP (n=4-5/grupo). Teste ANOVA, seguido de Tukey.

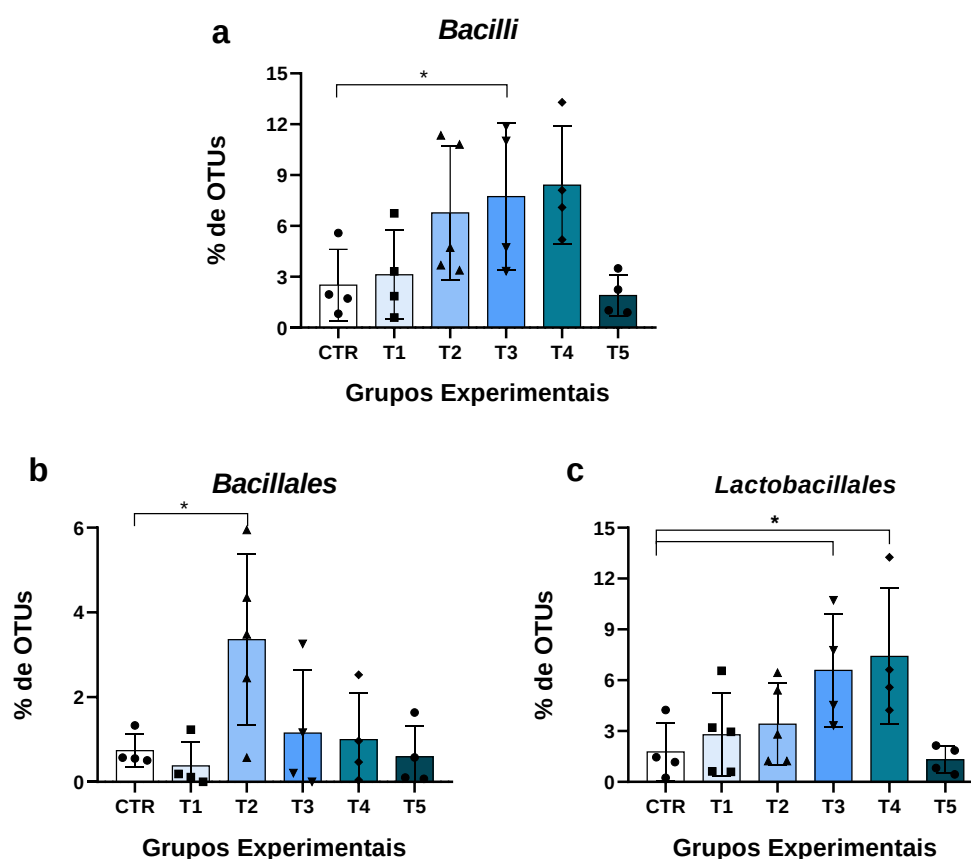


Figura 24: Gráficos representativos da distribuição do microbioma materno cecal, referentes ao delineamento 1, na classe *Bacilli* (a), e nas ordens *Bacillales* (b) e *Lactobacillales* (c). Dados apresentados como média ± DP (n=4-5/grupo). Teste ANOVA, seguido de Tukey. A diferença foi considerada estatisticamente significativa em relação ao CTR quando *p<0,05.

Em relação a análise do microbioma dos filhos machos pós-desmame, DPN22, não foi observado diferença estatística em nível de filo, classe e ordem (Figura 25a, b, c).

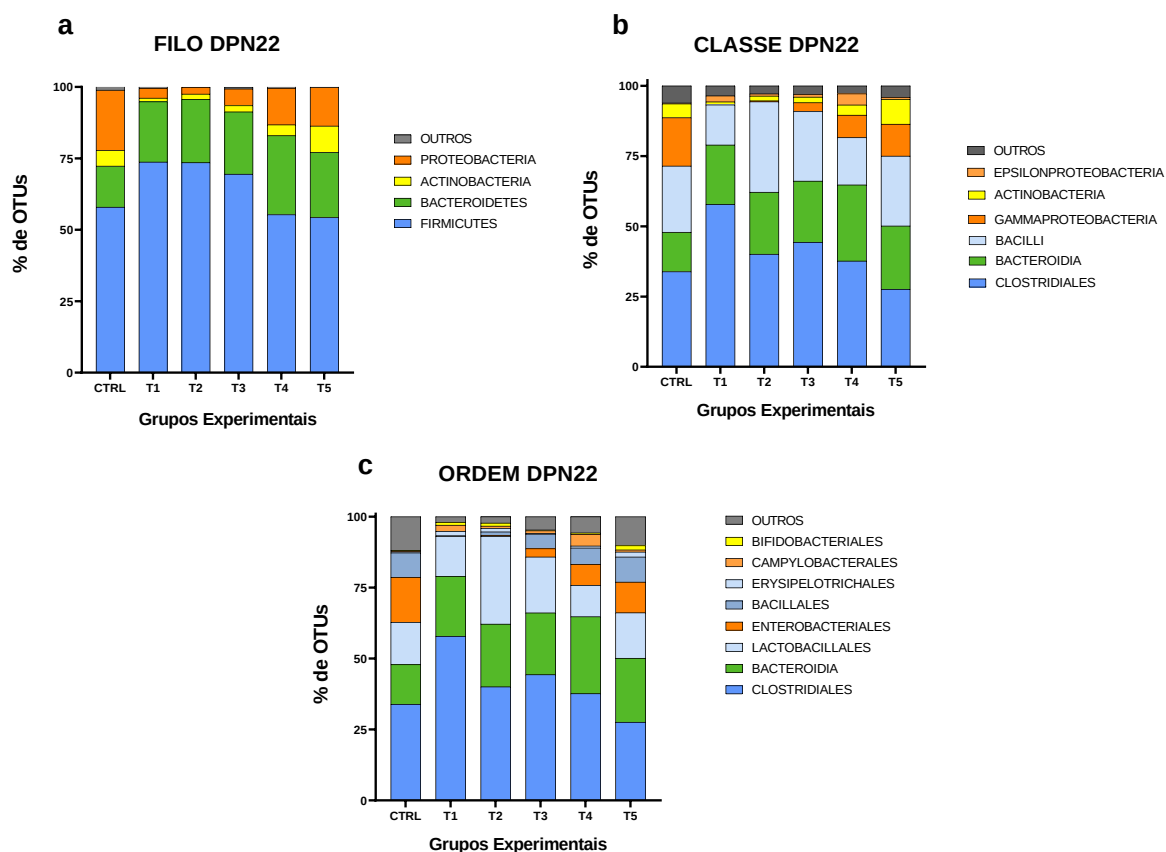


Figura 25: Gráficos representativos da distribuição do microbioma de ratos machos pós-desmame (DPN22), referentes ao delineamento 2, nos níveis de filo (a), classe (b) e ordem (c). Dados apresentados como média $\pm$ DP (n=4-5/grupo). Teste ANOVA, seguido de Tukey.

Foi realizado análise do Índice de Shannon, para determinar a diversidade alfa, nas amostras maternas (DG20) e amostras dos ratos machos pós-desmame (DPN22). Foi observado redução no grupo T1 em relação ao CTR, e aumento de T4 em relação ao grupo T1 (Figura 26a) nas mães (DG20). E em relação as amostras dos ratos machos no DPN22 não foi observado diferença significativa (Figura 26b).

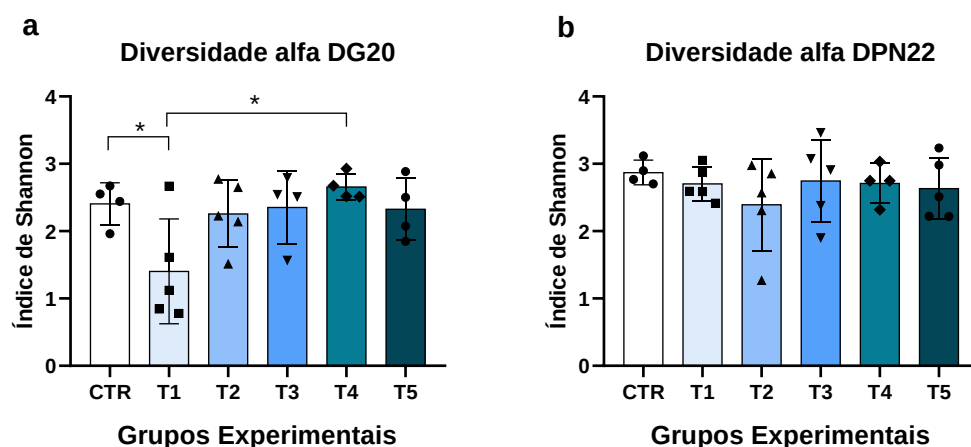


Figura 26: Gráficos representativos do Índice de Shannon, definido pela diversidade alfa, do microbioma materno (DG20) (a) e de ratos machos pós-desmame (DPN22) (b). Dados apresentados como média $\pm$ DP (n=4-5/grupo). Teste ANOVA, seguido de Tukey.

5. DISCUSSÃO

O estudo da composição do microbioma intestinal de ratos após exposição aos ftalatos e nanoplásticos é relevante para compreender os impactos desses poluentes no eixo intestino-placenta-feto. Ademais, vale ressaltar que os efeitos já relatados da exposição à poluentes ambientais na microbiota e no desenvolvimento fetal dependem do sexo, da idade, do tempo de exposição e da dose aplicada (Wang; Zhu; Kannan, 2019; Chiu et al., 2020; Cheng et al., 2023).

Os resultados da análise do microbioma cecal materno revelaram que, embora não tenham sido observadas diferenças significativas na abundância relativa a nível de filo, houve um aumento na classe *Bacilli* no grupo tratado com nanoplásticos (T3) e nas ordens *Bacillales* no grupo tratado com a maior dose de ftalatos (T2) e *Lactobacillales* nos grupos T3 e T4 (menor dose de ftalatos em conjunto com os nanoplásticos), todas pertencentes ao filo *Firmicutes*. Esses aumentos são particularmente interessantes, pois as bactérias do gênero *Bacillus* e *Lactobacillus* são conhecidas por desempenharem papéis fundamentais na manutenção da homeostase microbiana e na proteção contra patógenos (Gao et al., 2022), e talvez o aumento dessa ordem foi uma resposta compensatória aos efeitos da exposição. *Bacillales* é a ordem mais produtiva do filo *Firmicutes*, possuindo diversas aplicações biotecnológicas, industriais e farmacêuticas (Harirchi et al., 2022). Em um estudo recente, pesquisadores testaram o potencial de degradação do ftalato de benzil butila (BBP) e do ftalato de dimetila (DMP) por uma espécie da ordem *Bacillales*, verificaram que a taxa de degradação de ambos os ftalatos aumentou

conforme os parâmetros definidos pelos autores aumentaram, temperatura, pH e concentração (Kaur et al., 2021).

Ademais, o crescimento excessivo dessas bactérias pode potencialmente suprimir a diversidade microbiana ao competir por nutrientes com outras espécies benéficas, levando a um desequilíbrio na composição do microbioma materno, levando a uma disbiose. Este desequilíbrio é preocupante, uma vez que a microbiota intestinal materna não só influencia a saúde da mãe, mas também pode afetar o desenvolvimento fetal e a saúde neonatal (Yong; Valiyaveetil; Tang, 2020). Apesar de não terem sido observadas alterações na composição do microbioma dos filhos pós-desmame, esse fato deve levar em conta que o microbioma se desenvolve gradualmente na infância. Além disso, estudos anteriores têm mostrado que alterações na microbiota intestinal durante a gestação podem levar a complicações na prole como obesidade, diabetes gestacional e até mesmo desregulações imunológicas (Valdes et al., 2018; Hills et al., 2019). Outros estudos associaram a exposição a produtos químicos ambientais como ftalatos, bisfenóis e pesticidas a alteração da composição microbioma, expressão genética, função e efeitos adversos na saúde do hospedeiro (Chiu et al., 2020). Assim, a ausência de diferença nas análises do microbioma no DPN22, podem estar relacionadas a falta de maturação do microbioma intestinal nesses animais.

O cálculo do Índice de Shannon, usado para determinar a diversidade alfa, considera o número de espécies (riqueza) e a uniformidade (equidade) na amostra. Assim, quanto menor o valor do índice, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa. E quanto maior o valor do índice, maior tende a ser a sua diversidade. Aqui, foi observado uma redução da diversidade no grupo tratado com ftalato menor dose (T2), indicando que esse grupo possui uma menor riqueza e uniformidade quando analisamos a microbiota intestinal. Além disso, a disbiose taxonômica pode estar relacionada à redução de diversidade microbiana, normalmente apresentada pela proporção *Firmicutes/Bacteroidetes* alterada (Chiu et al., 2020), o que não foi observado aqui.

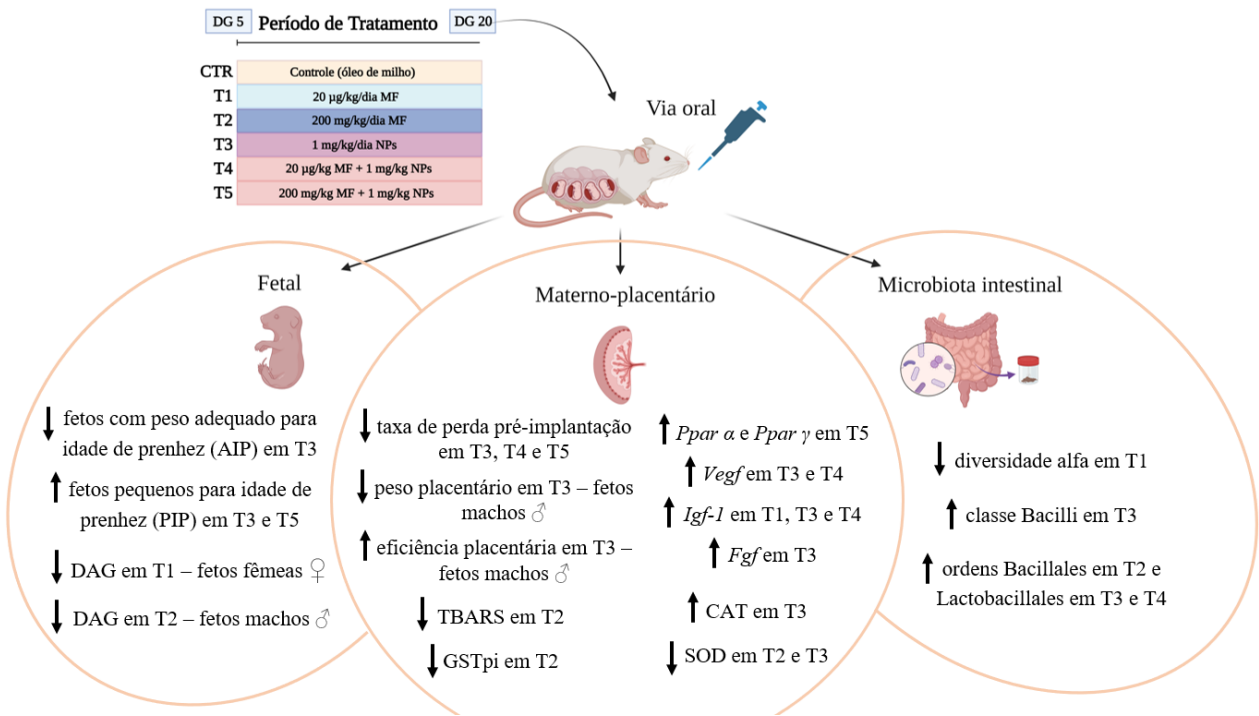
Dessa forma, uma limitação do nosso estudo é que nos concentramos em analisar apenas a composição da microbiota intestinal, deixando de lado mecanismos de atuação da microbiota, ou seja, como ela reage após a exposição aos poluentes ambientais, interferindo e modulando a saúde e doença da gestante, e conseqüentemente, do feto em desenvolvimento, ou do filho pós-desmame. Assim, nosso estudo representa um importante passo na compreensão dos efeitos desses poluentes ambientais na composição da microbiota e no desenvolvimento fetal, sendo

necessários estudos mais aprofundados, principalmente, sobre as questões mecánísticas da regulação da microbiota.

CONCLUSÃO

Como discutido acima, embora recentes e escassos, estudos em humanos e roedores sugerem que a exposição aos ftalatos e nanoplásticos interferem em diferentes alvos moleculares na placenta. A vida intrauterina é um período potencialmente crítico para os efeitos dos ftalatos e nanoplásticos na saúde, já que as vias de eliminação e desintoxicação não estão completamente maduras nesse período, e a placenta possui um papel chave nas mediações materno-fetais. Nosso trabalho demonstrou que a exposição aos ftalatos e nanoplásticos, isoladamente ou em conjunto, foram capazes de modular a fertilidade materna, ao aumentar a taxa de perda pré-implantação nos grupos expostos aos ftalatos e nanoplásticos combinados (T3, T4 e T5); reduzir peso placentário e reduzir o número de fetos adequados para idade de prenhez no grupo exposto somente aos nanoplásticos (T3). Além disso, esses compostos químicos alteraram a expressão gênica e proteica de importantes alvos relacionados a diferenciação trofoblástica, vascularização e angiogênese placentária nos grupos expostos com nanoplásticos isolados (T3) ou em conjunto com os ftalatos (T4 e T5). Enquanto os ftalatos sozinhos na dose mais alta (T2) impactam parte da ação antioxidante e potencialmente a peroxidação lipídica e o metabolismo energético, os NPs sozinhos (T3) indicam um atraso no desenvolvimento placentário, juntamente com um desequilíbrio antioxidante. Notavelmente, também foi observado um impacto na microbiota intestinal das mães expostas, ao aumentar classe *Bacilli* (T3) e as ordens *Bacillales* (T2) e *Lactobacillales* (T3 e T4). Assim como uma redução na diversidade alfa de amostras fecais maternas no grupo exposto somente aos ftalatos (T1). Mesmo que sejam necessários mais estudos para complementar esses achados e elucidar melhor os mecanismos envolvidos, nossos resultados reforçam os efeitos nocivos desses poluentes ambientais sobre a saúde materna e fetal.

RESUMO GRÁFICO DOS RESULTADOS DESTES TRABALHOS



6. REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, A. F. et al. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. **PloS one**, v. 3, n. 7, 30 jul. 2008.
- ARIFUZZAMAN, M. et al. Nutritional regulation of microbiota-derived metabolites: Implications for immunity and inflammation. **Immunity Cell Press**, 9 jan. 2024.
- CHENG, F. et al. Sex-specific association of exposure to a mixture of phenols, parabens, and phthalates with thyroid hormone and antibody levels in US adolescents and adults. **Environmental science and pollution research international**, v. 30, n. 57, p. 121207–121223, 1 dez. 2023.
- CHIU, K. et al. The Impact of Environmental Chemicals on the Gut Microbiome. **Toxicological Sciences**, v. 176, n. 2, p. 253, 1 ago. 2020.
- DENG, Y. et al. Microplastics release phthalate esters and cause aggravated adverse effects in the mouse gut. **Environment International**, v. 143, p. 105916, 1 out. 2020.
- FAN, Y. et al. Prenatal low-dose DEHP exposure induces metabolic adaptation and obesity: Role of hepatic thiamine metabolism. **Journal of hazardous materials**, v. 385, 5 mar. 2020.
- GAO, H. et al. The Functional Roles of *Lactobacillus acidophilus* in Different Physiological and Pathological Processes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 1226, 28 out. 2022.
- GARCÍA-MONTERO, C. et al. Nutritional Components in Western Diet Versus Mediterranean Diet at the Gut Microbiota-Immune System Interplay. Implications for Health and Disease. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 1–53, 1 fev. 2021.
- HARIRCHI, S. et al. Bacillales: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2022.
- HILLS, R. D. et al. Gut Microbiome: Profound Implications for Diet and Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2019.
- KAUR, R. et al. Biodegradation of endocrine disrupting chemicals benzyl butyl phthalate and dimethyl phthalate by *Bacillus marisflavi* RR014. **Journal of applied microbiology**, v. 131, n. 3, p. 1274–1288, 1 set. 2021.
- QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Database issue, 1 jan. 2013.
- SHUM, T. F.; WANG, L.; CHIOU, J. Impact of Plasticizer on the Intestinal Epithelial Integrity and Tissue-Repairing Ability within Cells in the Proximity of the Human Gut Microbiome. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2023.
- STINSON, L. F. Establishment of the early-life microbiome: a DOHaD perspective. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 11, n. 3, p. 201–210, 1 jun. 2020.
- TILVES, C. et al. Associations of Plastic Bottle Exposure with Infant Growth, Fecal Microbiota, and Short-Chain Fatty Acids. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, 1 dez. 2023.
- VALDES, A. M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 361, p. 36–44, 2018.

VIJAY, A.; VALDES, A. M. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. **European journal of clinical nutrition**, v. 76, n. 4, p. 489–501, 1 abr. 2022.

WANG, Y.; ZHU, H.; KANNAN, K. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. **Toxics**, v. 7, n. 2, p. 21, 2019.

YONG, C. Q. Y.; VALIYAVEETIL, S.; TANG, B. L. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 5, 1 mar. 2020.

ZHOU, C.; GAO, L.; FLAWS, J. A. Prenatal exposure to an environmentally relevant phthalate mixture disrupts reproduction in F1 female mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 318, p. 49–57, 1 mar. 2017.

ANEXOS

ANEXO 1: Lista de primers utilizados no RT-qPCR

Tabela 4: Sequência dos primers usados para a análise de RT-qPCR, contendo os códigos de acesso dos alvos analisados (GenBank).

Gene	Código de Referência (NCBI)	Sequência do primer (5'-3')
Gapdh (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)	NM_017008.4	F: TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA R: TATGAGACGAGGCTGGCACT
Ppar α (Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa)	NM_013196.2	F: ACTGTCCGCTACTTCGAGTC R: CCACAGAGCACCAATCTGTGA
Ppar γ (Receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama)	NM_001145366.1	F: CAGAAACTGGGAGTAGCCTG R: GCTCTACTTTGATCGCACTTTG
Vegf (Fator de crescimento de endotélio vascular)	NM_001110333.2	F: GAAAGCCCATGAAGTGGTGA R: GCTGGCTTTGGTGAGGTTTG
Plgf (Fator de crescimento placentário)	NM_053595.2	F: CAACAGAAATGGAAGTGGTGCC R: CAGCGACTCAGAAGGACACA
Fgf (Fator de crescimento de fibroblasto)	NM_012951.2	F: GGGAAACTCTATGGCTCAAAAG R: CCACATACATTTGCCTGCCG
Igf1 (Fator de crescimento semelhante à insulina)	NM_001082477.2	F: TGAGCGCACCTCCAATAAAGA R: GAACTGAAGAGCGTCCACCA
Cyp11b1 (Citocromo P450, família 11, subfamília b, polipeptídeo 2)	XM_039079756.1	F: GCCACGGACTAAACACAGGA R: CCAGTCTGCCCCATTTAGCA
Hsd11b2 (11-beta hidroxiesteroide desidrogenase)	NM_017081.2	F: TATGGAACCTCCAAGGCAGC R: CACATTAGTCACTGCCTCTGTC

ANEXO 2: Certificado CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Repercussões da exposição materna a nanoplásticos e ftalatos: aspectos maternos e susceptibilidade a oncogênese prostática em ratos", protocolada sob o CEUA nº 1174020523 (ID 000523), sob a responsabilidade de **Wellerson Rodrigo Scarano e equipe; Natalia Magosso; Vanessa Aguiar Rocha** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (IBB/UNESP) na reunião de 03/05/2023.

We certify that the proposal "Repercussions of maternal exposure to nanoplastics and phthalates: maternal aspects and susceptibility to prostatic oncogenesis in rats", utilizing 694 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 1174020523 (ID 000523), under the responsibility of **Wellerson Rodrigo Scarano and team; Natalia Magosso; Vanessa Aguiar Rocha** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the São Paulo State University/Biosciences Institute (IBB/UNESP) in the meeting of 05/03/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2023** a **06/2025** Área: **Ciências Biomédicas**

Origem: **CEMIB - UNICAMP**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **90 a 120 dias**

Quantidade: **694**

Linhagem: **Sprague Dawley**

Peso: **200 a 250 g**

Botucatu, 03 de maio de 2023

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

Prof. Assoc. Luis Fernando Barbisan

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

