Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Gabriel Magalhães Oliveira Rigo

Exposição ao nanoplástico de poliestireno durante os períodos juvenil e puberal: impacto sobre a morfofisiologia testicular e funcionalidade espermática

Uberaba
2026

Gabriel Magalhães Oliveira Rigo

Exposição ao nanoplástico de poliestireno durante os períodos juvenil e puberal: impacto sobre a morfofisiologia testicular e funcionalidade espermática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Eloísa Munhoz de Lion Siervo
Coorientador:Prof. Dr. Hugo Felix Perini

Uberaba
2026

Catalogação na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Rigo, Gabriel Magalhães Oliveira
R428e Exposição ao nanoplástico de poliestireno durante os períodos juvenil e puberal: impacto sobre a morfofisiologia testicular e funcionalidade espermática / Gabriel Magalhães Oliveira Rigo. – 2026.
52 p.: il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2025
Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Eloísa Munhoz de Lion Siervo

1. Microplásticos. 2. Puberdade. 3. Testículo. 4. Motilidade dos espermatozoides. I. Siervo, Gláucia Eloísa Munhoz de Lion. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 628.4.043

Cicera Daniele da Silva - Bibliotecária - CRB-6/3012

Gabriel Magalhães Oliveira Rigo

Exposição ao nanoplástico de poliestireno durante os períodos juvenil e puberal: impacto sobre a morfofisiologia testicular e funcionalidade espermática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Eloísa Munhoz De Lion Siervo
Coorientador: Prof. Dr. Hugo Felix Perini

16 de Dezembro de 2025

Banca Examinadora:

_____

Profa. Dra. Gláucia Eloísa Munhoz De Lion Siervo (orientadora)
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

_____

Profa. Dra. Rafaela Pires Erthal Michelato
Universidade Federal do Paraná

_____

Prof. Dra. Juliana Reis Machado e Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedico este trabalho à minha família, por todo o apoio e amor incondicional. À minha família, ao povo da rua, e à linha das almas da Umbanda por guiarem e iluminarem meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, cuja presença constante e apoio incondicional foram fundamentais ao longo de esta jornada. Sem vocês, este trabalho não seria possível. Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro em forma de bolsa, sem ele não seria possível esse trabalho, juntamente com a FAPEMIG (APQ-00221-22) pelo fomento essencial para financiar todos os gastos provenientes dessa pesquisa. À Umbanda, manifesto minha gratidão pela proteção espiritual, orientação e força que me guiaram nos momentos de desafio e superação. À minha orientadora, Profa. Glaucia, agradeço profundamente pela sabedoria, paciência e incentivo. Sua orientação foi crucial para a realização deste trabalho, e sou grato pela confiança depositada em mim. E por fim a todos os integrantes do grupo ReproDevo em especial a Cristiana e a Nicoly, que me auxiliaram em todas as etapas e dificuldades. Por fim gostaria de agradecer a Bruna que me auxiliou em todas as etapas na trajetória do mestrado.

“[...]Escolas que são asas, não amam pássaros engaiolados.
O que elas amam são pássaros em voo.
Existem para dar aos pássaros coragem para voar.[...]”

Rubem Alves

RESUMO

A produção global de plástico tem aumentado significativamente a cada ano. Quando descartados, os itens plásticos sofrem ação ambiental, resultando na formação de pequenas partículas denominadas de nanoplásticos (NP). Os NP são contaminantes, estão presentes na água e nos alimentos, além de se acumularem ao longo da cadeia trófica. Neste contexto, o poliestireno (PS) é um tipo de plástico utilizado para a produção de diversos produtos, incluindo embalagens descartáveis, brinquedos e escovas dentais. Além de afetar a saúde do adulto, é conhecido que a exposição a contaminantes ambientais em janelas críticas do desenvolvimento pode levar a prejuízos duradouros. Uma vez que no período pós-natal acontecem eventos celulares e moleculares necessários para a aquisição da capacidade reprodutiva, o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição a nanoplásticos de poliestireno (NP-PS) durante o período juvenil e puberal pode influenciar o desenvolvimento pós-natal dos testículos e a funcionalidade espermática de camundongos machos. Para tanto, foram utilizados 45 camundongos machos (C57BL/6) com 21 dias, divididos em 3 grupos experimentais: grupo Controle, que recebeu somente o veículo (tampão fosfato-salino, PBS) e outros dois grupos que receberam solução de NP-PS nas doses de 1mg/dia e 0,1mg/dia. Os animais receberam o composto via gavagem, diariamente, durante 50 dias. O período experimental ocorreu entre o dia pós-natal (DPN) 21 e o DPN 71. Posteriormente, os animais passaram eutanásia para a coleta dos testículos e ductos deferente (para retirada de espermatozoides). Foram avaliados os pesos dos animais, pesos do testículo e epidídimos, além da histopatologia, a morfometria e a dinâmica da espermatogênese nos testículos. Foram quantificados os níveis séricos de testosterona e estradiol. Os espermatozoides foram avaliados pela sua morfologia, atividade mitocondrial, motilidade e vitalidade, além da maturação da cromatina. Os dados obtidos passaram por teste estatístico, e foram considerados significativos quando $p<0,05$. Foi observado uma diminuição nos túbulos seminíferos normais nos camundongos que receberam NP-PS, independente da dose. Além disso, houve um aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos dos camundongos expostos a maior dose, bem como um aumento na espessura do epitélio germinativo dos camundongos expostos a ambas as doses, em comparação com o grupo controle. A dinâmica da espermatogênese não foi alterada pela exposição ao NP-PS, bem como as concentrações séricas de testosterona e estradiol. Em relação aos espermatozoides,

o número de espermatozoides móveis diminuiu pela exposição à maior dose, enquanto o número de espermatozoides com morfologia normal diminuiu pela exposição a ambas as doses. A porcentagem de espermatozoides sem atividade mitocondrial (bainha não-corada) aumentou em ambos os grupos expostos ao NP-PS. Não foram observadas diferenças no número de espermatozoides mortos ou com cromatina madura entre os grupos expostos e o grupo controle. Os pesos corporais, dos testículos e espidídimos também não foram alterados pela exposição ao NP-PS. Dessa forma, pode-se concluir que a exposição ao NP-PS durante o período de desenvolvimento pós-natal compromete a estrutura testicular, afetando a funcionalidade espermática em camundongos machos.
Palavras-Chave: plástico; testículo; espermatozoide; puberdade.

ABSTRACT

Global plastic production has increased significantly each year. Once discarded, plastic items undergo environmental degradation, resulting in the formation of small particles known as nanoplastics (NP). These NP are contaminants found in water and food and accumulate throughout the trophic chain. In this context, polystyrene (PS) is a type of plastic widely used in the manufacture of various products, including disposable packaging, toys, and toothbrushes. In addition to affecting adult health, it is well established that exposure to environmental contaminants during critical developmental windows can lead to long-lasting impairments. Since the postnatal period encompasses essential cellular and molecular events required for the acquisition of reproductive capacity, the aim of this study was to evaluate whether exposure to polystyrene nanoplastics (PS-NP) during the juvenile and pubertal periods influences postnatal testicular development and sperm function in male mice. A total of 45 male C57BL/6 mice aged 21 days were divided into three experimental groups: a Control group, which received only the vehicle (phosphate-buffered saline, PBS), and two groups that received PS-NP solutions at doses of 1 mg/day and 0.1 mg/day. Animals received the compound daily by gavage for 50 days. The experimental period occurred between postnatal day (PND) 21 and PND 71. After treatment, animals were euthanized for collection of the testes and vas deferens (for sperm retrieval). Body weight, testis and epididymis weights were measured, and testicular histopathology, morphometry, and spermatogenesis dynamics were evaluated. Serum testosterone and estradiol levels were quantified. Sperm were analyzed for morphology, mitochondrial activity, motility, viability, and chromatin maturation. Data were statistically analyzed, assuming significance at $p < 0.05$. A reduction in the proportion of normal seminiferous tubules was observed in mice exposed to PS-NP, regardless of dose. Additionally, exposure to the higher dose increased seminiferous tubule diameter, while both doses increased germinal epithelium thickness compared with the control group. Spermatogenesis dynamics, as well as serum testosterone and estradiol levels, were not affected by PS-NP exposure. Regarding sperm parameters, the number of motile sperm decreased in the higher-dose group, and the proportion of sperm with normal morphology decreased in both exposed groups. The percentage of sperm lacking mitochondrial activity (unstained sheath) increased in both treated groups. No differences were found in the number of dead sperm or in chromatin maturation between exposed and control groups. Body weight and testis and epididymis weights were also unaffected by

PS-NP exposure. In conclusion, exposure to PS-NP during the postnatal developmental period compromises testicular structure and impairs sperm functionality in male mice.
Keywords: Plastic; Testis; Sperm; Puberty.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DAB – 3,3'-Diaminobenzidina Tetrahidrocloreto

DHT – Di-hidrotestosterona

DPN – Dia Pós-Natal

FFCLRP – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais HE – Hematoxilina e Eosina

LH – Hormônio Luteinizante

LaMMoBi – Laboratório Multiusuário de Modelos Biológicos MP – Microplástico

MP-PS – Microplástico de Poliestireno

NP – Nanoplástico

NP-PS – Nanoplástico de Poliestireno

PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino) PKA – Proteína Quinase A

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SIRT1 – Sirtuina 1

StAR – Proteína Reguladora Aguda de Esteróides

USP – Universidade de São Paulo

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 PLÁSTICO E MICROPLÁSTICOS 13
1.2 SISTEMA GENITAL MASCULINO E ESPERMATOGÊNESE 16
1.3 DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO SISTEMA GENITAL MASCULINO EM CAMUNDONGOS 20
1.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO A MICRO E NANOPLÁSTICO SOBRE O SISTEMA GENITAL MASCULINO 21
2 HIPÓTESE 22
3 JUSTIFICATIVA 23
4. OBJETIVOS 24
4.1 OBJETIVO GERAL 24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24
5 METODOLOGIA 25
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 25
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE POLIESTIRENO (NP-PS) 25
5.3 COLETA DOS MATERIAIS 26
5.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS TESTÍCULOS 26
5.4.1 Avaliação Histopatológica 26
5.4.2 Avaliação Morfométrica 26
5.4.3 Avaliação do Processo Espermatogênico 27
5.5 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE ESPERMATOZOIDES 28
5.5.1 Motilidade Espermática 28
5.5.2 Vitalidade Espermática 28
5.5.3 Avaliação da Atividade Mitocondrial Espermática 29
5.5.4 Maturação da Cromatina Espermática 29
5.6 AVALIAÇÃO HORMONAL 30
5.6.1. Testosterona 30
5.6.2 Estradiol 31
5.7 ESTATÍSTICA 31
6 RESULTADOS 32
6.1 PESO CORPORAL, DOS TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS 32
6.2. PARÂMETROS HORMONAIS 33
6.3 PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS 33
6.4 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA TESTICULAR 35
6.5 AVALIAÇÃO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO 36
6.6 PARÂMETROS ESPERMÁTICOS 37
6.6.1 Atividade Mitocondrial Espermática 38
7 DISCUSSÃO 40
8 CONCLUSÕES 43
REFERÊNCIAS 44
ANEXO A - PARECER DO CEUA.....50

1 INTRODUÇÃO

O plástico foi criado no século XX, advindo da polimerização de polímeros sintéticos, com o objetivo de criar um material barato e de fácil manuseio (Rodrigues, 2024). Devido seu baixo custo e ampla aplicação, a produção global de plástico está em constante crescimento. Somente em 2020, 375,5 milhões de toneladas de plástico foram produzidas em todo o mundo e em 2021 a produção chegou a 390,7 milhões de toneladas. A estimativa é que esse número pode aumentar significativamente nos próximos anos (Plastics Europe, 2022; Lebreton; Andrady, 2019).

Em decorrência da sua estabilidade e durabilidade, estes materiais persistem no ambiente por várias décadas e representam um grande problema ambiental. A maior parte da poluição por plástico resulta de grandes itens (macroplásticos), como garrafas, sacolas, embalagens descartáveis de alimentos e de cosméticos. Os macroplásticos podem ser degradados pela ação dos raios solares (radiação ultravioleta), do vento e de outras forças mecânicas, produzindo pequenas partículas plásticas, que têm sido grande fonte de contaminação ambiental. Estas pequenas partículas são denominadas de microplásticos (MP) quando menores que 5 mm; ou de nanoplásticos (NP), quando menores que 1 μm (Waring; Harris; Mitchell, 2018).

Em um estudo conduzido com *Daphnia galeata*, um crustáceo de água doce, foi observado que a exposição a 5 mg/L de nanoplástico de poliestireno (NP-PS) por 5 dias afetou significamente aspectos reprodutivos, como motilidade e vitalidade espermática (Cui *et al.*, 2017). Estudos em roedores destacam efeitos tóxicos nos rins a 0,1 mg/L ou 1 mg/L de MP (Shen *et al.*, 2023), intestino a partir de 2,5 mg/kg de peso corporal (Liang *et al.*, 2021)e metabolismo energético em 0,01 mg/dia de MP (Deng *et al*., 2017).

Recentemente, Jin *et al*. (2021) demonstraram efeitos tóxicos de micropartículas de poliestireno (10 e 4 μm / dia) no sistema genital masculino e espermatozoides de camundongos machos adultos. Similarmente, Zolotova *et al.* (2024) relataram que a exposição a partículas de poliestireno de 5 μm altera o perfil inflamatório e prejudica os espermatozoides de camundongos machos. No entanto, ainda há uma lacuna de informações sobre o impacto da exposição a nanopartículas de poliestireno durante o desenvolvimento pós-natal e se as possíveis alterações persistem até a vida adulta.

1.1 PLÁSTICO E MICROPLÁSTICOS

Cerca de 90% do total de plástico produzido é feito de polímeros sintéticos derivados de petroquímicos. Estes são classificados como termoplásticos, que consistem em uma família de resinas que se tornam maleáveis e permitem modelagem quando aquecidas e, quando resfriadas, tornam-se endurecidas. Os termoplásticos podem ser reaquecidos e resfriados inúmeras vezes sem que o material perca suas características de durabilidade e resistência. Dentre os termoplásticos estão: polietileno (PE), polipropileno (PP), polivinil cloreto (PVC), politereftalato de etileno (PET) e poliestireno (PS) (Plastics Europe, 2022).

O PS é um dos pioneiros no campo dos termoplásticos, tendo a primeira planta industrial bem-sucedida em operação na IG Farbenindustrie, na Alemanha, em 1930. Nos Estados Unidos, a produção comercial em larga escala começou em 1938 pela Dow Chemical Company. Em razão de suas propriedades como transparência e facilidade de coloração, o PS tornou-se amplamente utilizado na indústria alimentícia e outros setores estratégicos, passando por eletrodomésticos e eletroeletrônicos, brinquedos e itens descartáveis (Montenegro; Serfaty, 2002).

Assim como a maioria dos plásticos, o PS representa um material de baixo custo, facilmente moldável, hidrofóbico, bioinerte e de alta durabilidade que pode ser usado em uma ampla variedade de produtos (Lebreton; Andrady, 2019). Muitos itens plásticos chegam aos mares e oceanos, onde têm se acumulado ao longo dos anos e têm se degradado a MP e NP. Essas pequenas partículas são ingeridas por organismos marinhos, como peixes, bivalves e zooplâncton. Alguns estudos relatam que os MP e NP são transferidos ao longo da cadeia trófica, chegando a organismos maiores, incluindo humanos (Karapozis; Giordani; Loiselle, 2021). Além disso, a literatura mostra que a utilização de itens plásticos para manipulação, preparação e armazenamento de alimentos, seja em escala industrial ou uso doméstico, aumenta o risco de liberar MP e NP (figura 1) nos alimentos consumidos (Hussain *et al*., 2023).

Os estudos ecotoxicológicos sobre a presença e os efeitos dos micro e nanoplásticos em organismos marinhos estão amplamente consolidados, abrangendo fito/zooplâncton, invertebrados e plantas (Gesamp, 2015). Evidências indicam que, apesar dos efeitos adversos já conhecidos em animais marinhos, essas partículas se acumulam na cadeia trófica, afetando animais maiores, incluindo peixes e humanos (figura 2) (Kik; Bukowska; Sicinska, 2020). Além disso, há relatos de absorção dessas partículas por plantas por meio de folhas e raízes, reforçando o acúmulo de MP e NP ao longo da cadeia trófica (Borges *et al.*, 2022).

Evidências recentes demonstram que os nanoplásticos são capazes de atravessar barreiras biológicas e se distribuir sistemicamente, comprometendo diferentes sistemas fisiológicos, como o digestório, circulatório, nervoso e endócrino (Rigo *et al*., 2025).

Figura 1 - Figura representativa da fragmentação e vias de contaminação



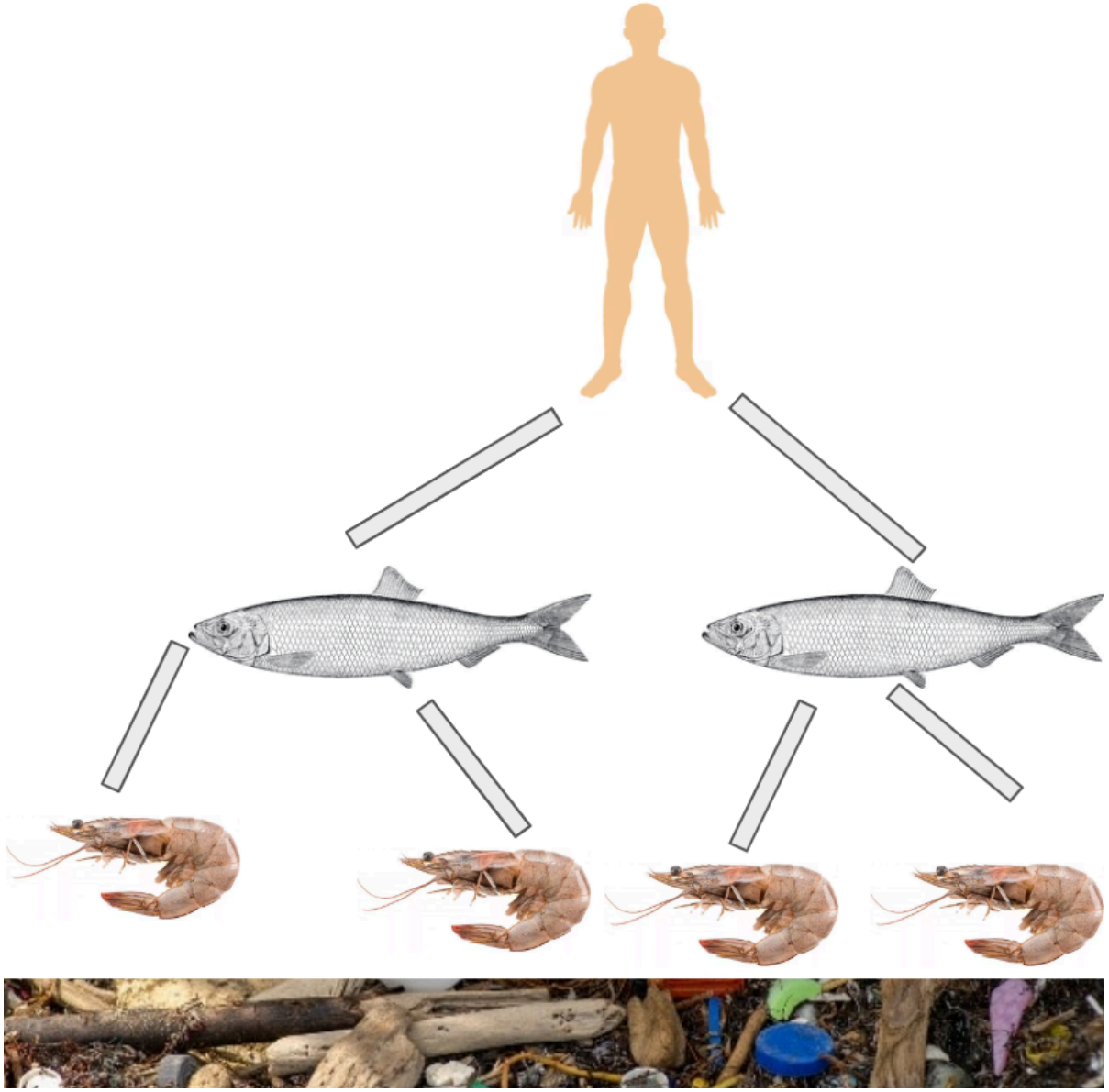
*Através de alimentos com partículas plásticas como bolachas, café em copos plásticos, refrigerantes, entre outros

**Por meio de ar contaminado em vias de alto fluxo, carro exposto ao sol, entre outros.

*** Em cremes, esfoliantes, tecidos, entre outros.

Fonte: Waring; Harris; Mitchell, 2018; Gaylarde *et al* 2021.

Figura 2 - Figura representativa da bioacumulação do nanoplástico ao longo da cadeia trófica



Representação da bioacumulação de plástico

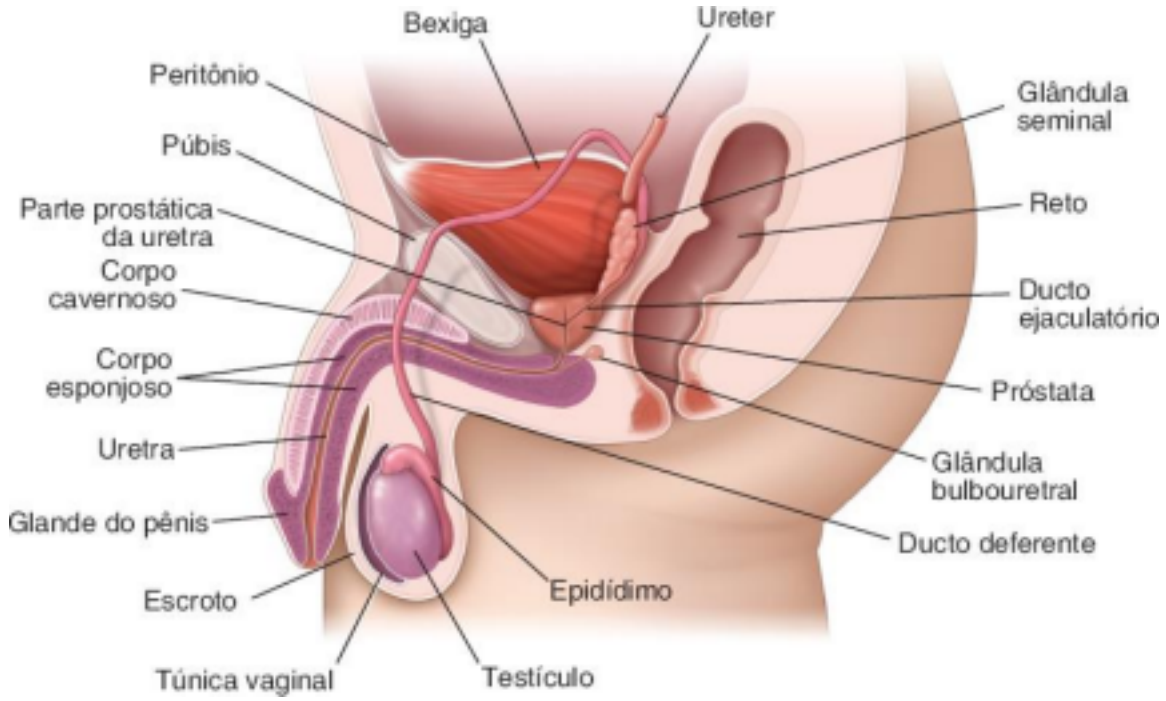
Fonte: elaboração própria 2025.

Uma vez nos organismos, o NP pode perturbar a homeostase induzindo o estresse oxidativo, aumentando das espécies reativas de oxigênio. Este aumento pode causar dano mitocondrial (Zheng *et al.*, 2019) e inflamação, por meio da liberação de TNF-α e IL-10 (Wang *et al.* 2023), que são dependentes da dose e tempo de exposição. A literatura mostra que a exposição ao NP-PS levou a morte celular devido à mitofagia excessiva em células SH-SY5Y e neurônios dopaminérgicos, ativadas pela via AMPK/ULK1 (Huang *et al.*, 2023). Outro mecanismo bem relatado é o desbalanço hormonal devido a alterações na expressão gênica de receptores hormonais (Bossi *et al.*, 2025).

1.2 SISTEMA GENITAL MASCULINO E ESPERMATOGÊNESE

O sistema genital consiste em órgãos e tecidos que fornecem a capacidade reprodutiva da espécie. Nos mamíferos este sistema é composto por testículos, epidídimos, ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias e genitália externa - formada pelo pênis e escroto (Figura 3).

Figura 3 - Ilustração representativa do sistema genital masculino



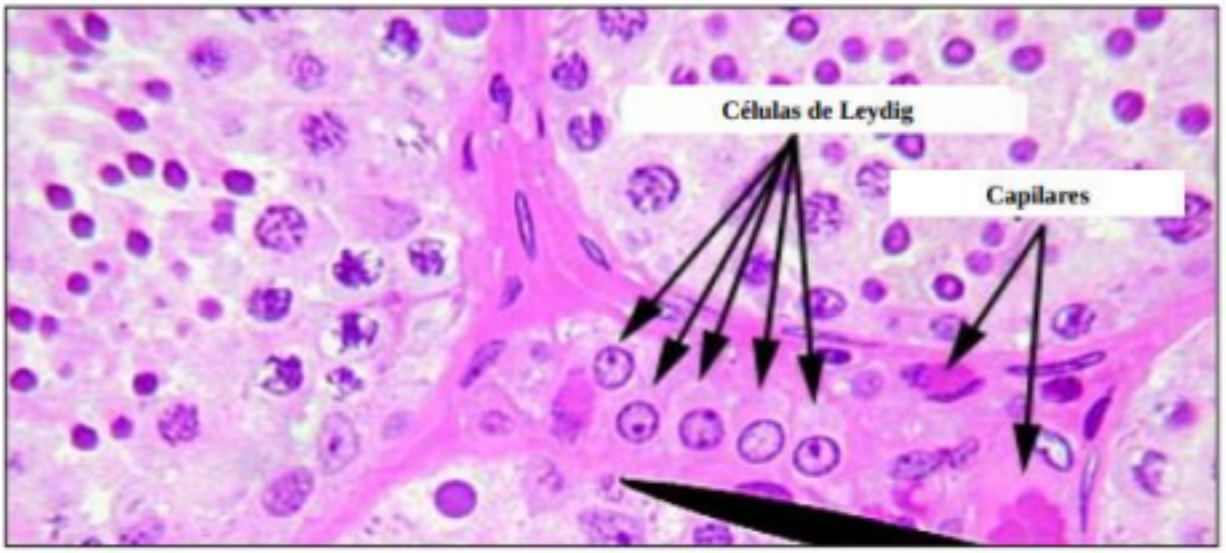
Fonte: Pawlina; Ross, 2021.

Os testículos são órgãos pares, localizados no escroto e são responsáveis pela gametogênese e produção de hormônios, como testosterona, dihidrotestosterona, hormônio anti-mülleriano, inibina b, androstenediona e dehidroepiandrosterona. Cada testículo possui uma cápsula de tecido conjuntivo denso denominada de túnica albugínea. Essa, por sua vez, se espessa na superfície dorsal, formando o mediastino testicular. Esses septos penetram no testículo, dividindo-o em aproximadamente 250 compartimentos piramidais chamados de lóbulos testiculares. Em cada lóbulo, quatro túbulos seminíferos se alojam em novelamento e são responsáveis pela maturação espermatogonial. O estroma do órgão é rico em vasos

sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e células intersticiais (Junqueira; Carneiro, 2013, p. 412).

As células de intersticiais de Leydig (Figura 4) tem como principal função a produção de testosterona, o principal hormônio androgênico masculino, que é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundários, e essencial para a manutenção da espermatogênese (Ge; Li; Wang, 2021). A produção de testosterona é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH) secretado pela hipófise, e esse hormônio age tanto localmente sobre os túbulos seminíferos, quanto sistemicamente em diversos órgãos-alvo do corpo masculino. Em menor escala, essas células também podem sintetizar outros esteroides, como androstenediona e di hidrotestosterona (DHT) (Ge; Li; Wang, 2021).

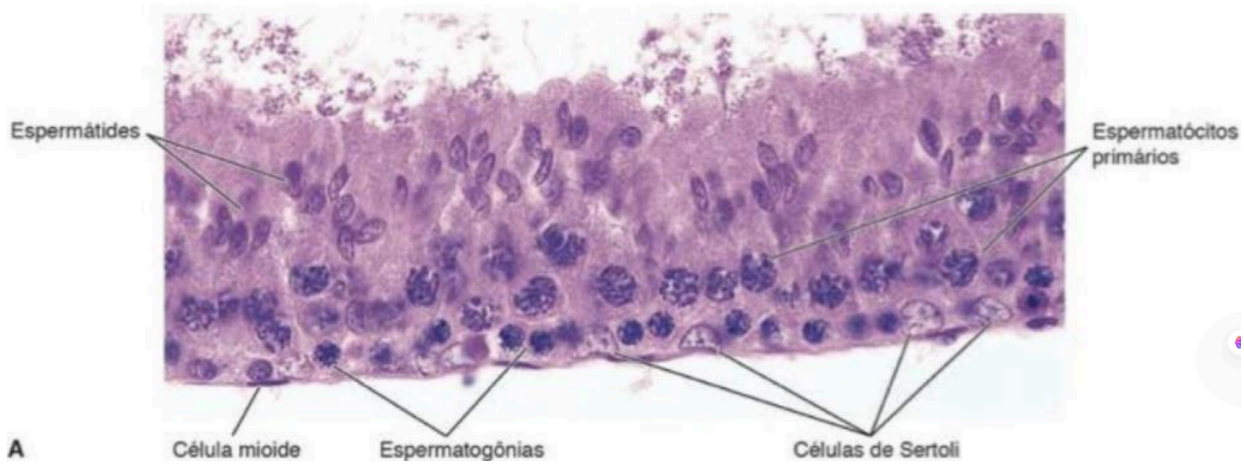
Figura 4 - Fotomicrografia do interstício dos túbulos seminíferos em camundongos



Fonte: Zorzetto, 2007, p. 21.

As células de Sertoli (Figura 5) estão localizadas no epitélio seminífero, fixadas à lâmina basal e se estendem até o lúmen dos túbulos. Elas desempenham funções no processo de espermatogênese, e proporcionam suporte físico, metabólico e nutricional às células da linhagem germinativa em desenvolvimento, formando o ambiente adequado para a sua diferenciação (Thumfart *et al.*, 2023). Além disso, por meio de suas junções intercelulares, formam a chamada barreira hematotesticular, uma estrutura que protege as células germinativas contra agentes imunológicos e substâncias tóxicas, separando os compartimentos basal e adluminal dos túbulos. Elas também realizam fagocitose dos restos citoplasmáticos das células germinativas durante a espermiogênese, promovendo a organização do ambiente testicular (Thumfart *et al.,* 2023).

Figura 5- Fotomicrografia representativa do epitélio seminífero

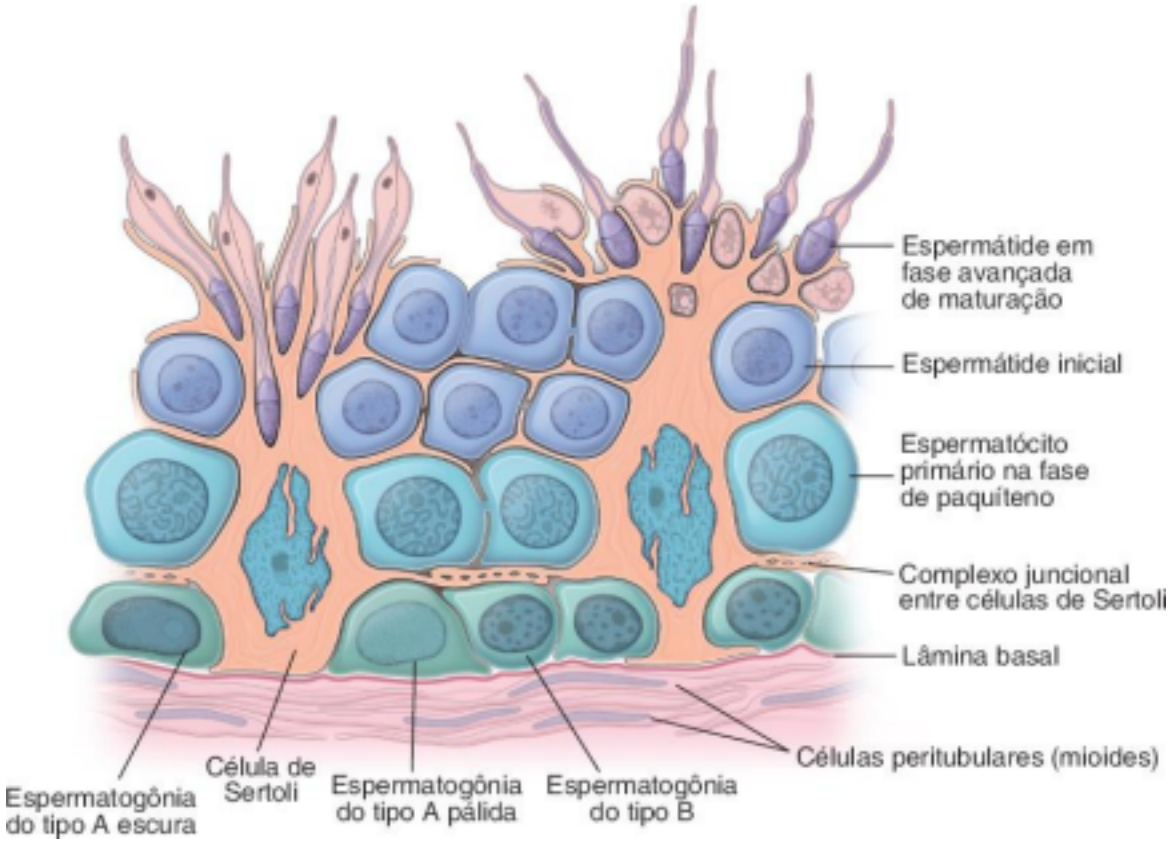


Fonte: Junqueira; Carneiro, 2013, p. 414.

A espermatogênese consiste no processo de produção de espermatozoides e tem duração variada a depender da espécie. Nos humanos, este processo tem duração de cerca de 70 dias, enquanto nos camundongos a duração média é de 35 dias (Tanaka; Baba, 2005). Neste período, duas etapas predominam: as divisões mitóticas das espermatogônias tipo A, que produzem uma população reserva de espermatogônias; e o desenvolvimento de espermatogônias tipo A em espermatogônias tipo B, que se diferenciam até formar os espermatozoides (Aponte; Rooji; Bastidas, 2005).

Durante esta mitose, as espermatogônias do tipo B dão origem a espermatócitos primários, células diploides. Que por sua vez, passam pela primeira divisão meiótica, formando os espermatócitos secundários haploides. Após a segunda divisão meiótica formam-se as espermátides imaturas ou arredondadas. O processo final da espermatogênese é a espermiogênese, no qual as espermátides passam por uma citodiferenciação morfológica - as células arredondadas adquirem a morfologia característica do espermatozoide. Finalizada a espermiogênese, os espermatozoides são então liberados na luz dos túbulos seminíferos (Miyata *et al.*, 2024) (Figura 6).

Figura 6 - Ilustração das células que compõe os túbulos seminíferos



Fonte: Junqueira; Carneiro, 2013, p. 414.

Ao final da espermiogênese, os espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos, seguindo para as vias extra testiculares. De início transitam no interior dos túbulos retos a alcançar a rede testicular, nela são conduzidos aos ductos eferentes. Esses ductos chegam no epidídimo, órgão segmentado responsável pela maturação funcional dos espermatozoides com motilidade modificações na membrana plasmática que permite o reconhecimento da zona pelúcida. Concluído esse processo, os espermatozoides permanecem armazenados na cauda do epidídimo para serem conduzidos até os ductos deferentes e ejaculadores. Com a ejaculação, os espermatozoides passam pela uretra e se misturam às secreções acessórias, dando origem ao sêmen (Hess *et al*., 2002).

As vias condutoras, por sua vez, que incluem epidídimos, ductos deferentes e uretra, são fundamentais para o transporte dos espermatozoides. Histologicamente, o epidídimo é composto por um epitélio pseudoestratificado colunar, predominantemente formado por

células principais (ou principais colunares) com estereocílios, células basais, células claras, entre outras, apoiadas sobre uma lâmina basal contínua e circundadas por uma fina camada de músculo liso, cuja espessura aumenta do caput à cauda, auxiliando no transporte dos espermatozoides por contrações peristálticas (Rinaldi *et al.*, 2020).

As glândulas anexas, como as vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais, contribuem com conteúdo seminal para a nutrição e viabilidade dos gametas. O pênis, por sua vez, desempenha a função copuladora, depositando os gametas no sistema reprodutor feminino (Benoit, *et al.,* 1987).

1.3 DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO SISTEMA GENITAL MASCULINO EM CAMUNDONGOS

O período pós-natal é caracterizado por intensas mudanças fisiológicas, anatômicas e comportamentais, incluindo a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, essencial para integrar respostas endócrinas, nervosas e imunes, especialmente sob estresse (Schmidt *et al.*, 2003). Além disso, o perfil da microbiota intestinal também sofre alterações ao longo desse período, conforme demonstrado por revisão sistemática de Rakoff-Nahoum *et al.* (2015). No sistema reprodutor masculino, essas transformações incluem o desenvolvimento dos túbulos seminíferos e das células germinativas.

No período neonatal (DPN 3–7), os túbulos seminíferos contêm gonócitos e células de Sertoli imaturas em intensa atividade mitótica. Durante a fase infantil (DPN 8–14), inicia-se a proliferação de espermatogônias e de células de Sertoli, culminando, no final dessa fase (DPN 15–20), no pico de densidade de espermatogônias (Picut *et al.*, 2015). A quantidade de espermatogônias do tipo A aumenta de $0{,}2 \times 10^5$ no DPN 3 para $6{,}5 \times 10^5$ no DPN 21 (Vergouwen *et al.*, 1993). A partir do DPN 22, transcritos específicos de espermátides, como o mRNA de MP1, tornam-se detectáveis, coincidindo com o surgimento das primeiras espermátides arredondadas e indicando a reprogramação molecular que marca a transição do período juvenil para o puberal (On Reproductive, 1989; Margolin *et al.*, 2014). No período juvenil (DPN 21–32), há aumento de espermatócitos paquítenos e o aparecimento de espermátides arredondadas, sinalizando o fim da arquitetura testicular infantil (Picut *et al.*, 2015). A presença de espermatozoides na cauda do epidídmo pode ser observada por volta da quinta semana de vida, embora ainda sem capacidade de fertilização (Zhang *et al.*, 2024).

Entre o DPN 32–55, os túbulos alcançam o estágio VII de maturação, e espermatozoides alongados tornam-se evidentes, com a maturação testicular sendo concluída

por volta do DPN 46 (Picut *et al*., 2015). A capacidade fecundante surge por volta do DPN 37, embora inicialmente baixa (2,9%), atingindo aproximadamente 72% no DPN 40 (Mochida *et al*., 2019).

1.4 EFEITO DA EXPOSIÇÃO A MICRO E NANOPLÁSTICO SOBRE O SISTEMA GENITAL MASCULINO

A literatura demonstra que o sistema reprodutor masculino é sensível aos efeitos adversos da exposição a micro e nanoplásticos. Fang Wnag, Xiong (2024) mostraram que camundongos machos C57BL/6, expostos por quatro semanas a microplásticos de poliestireno de 5 μm (0,25; 0,5; e 1 mg/dia), apresentaram redução significativa na contagem e motilidade espermática, além de aumento na taxa de anomalias morfológicas dos espermatozoides. Alterações estruturais também foram observadas nos testículos, incluindo desenvolvimento anormal dos túbulos seminíferos e prejuízo funcional das espermatogônias. De forma mais ampla, evidências apontam que a exposição a nano e microplásticos (N/MPLs) durante o desenvolvimento reprodutivo está associada a infertilidade, abortos espontâneos e malformações congênitas. Muitos desses efeitos decorrem dos aditivos presentes nos polímeros, como plastificantes e biocidas, capazes de interferir no sistema endócrino e exercer ações imunotóxicas (Niccolai; Colzi; Amedei, 2023).

Outros estudos experimentais reforçam esses achados. Zhao *et al.* (2023) demonstraram que a exposição pré e pós-natal a PS-MPs em fêmeas prenhes e suas proles induz distúrbios no desenvolvimento testicular a partir do DPN 35, acompanhados de disfunção espermatogênica até o DPN 70, mesmo em baixas concentrações (0,5–50 mg/L). De forma semelhante, Lu *et al.* (2023) observaram que a exposição a micro e nanoplásticos ativa vias associadas à apoptose germinativa, como a via p53. Em modelo crônico, camundongos Balb/c tratados com PS-MPs (0,5; 4; e 10 μm, 100 e 1000 μg/L, por 180 dias) apresentaram disfunção reprodutiva e redução dos níveis de testosterona via modulação da via LHR/cAMP/PKA/StAR dependente de LH (Jin *et al.*, 2022). Considerando esse conjunto de evidências, o presente estudo busca esclarecer os impactos da exposição a nanoplásticos de poliestireno durante os períodos juvenil e puberal sobre a morfofisiologia testicular e a funcionalidade espermática em camundongos.

2 HIPÓTESE

A hipótese desse estudo é que a exposição ao nanoplásticos de poliestireno (NP-PS) durante o período juvenil e puberal DPN 22 a 72 afeta o desenvolvimento testicular e afeta a qualidade espermática, por ação do desbalanço hormonal em camundongos.

3 JUSTIFICATIVA

A qualidade seminal e o número de espermatozoides vêm diminuindo ao longo das décadas. Esta é uma constatação tanto para humanos quanto para animais de vida livre (Luo *et al.*, 2023). Em humanos, o declínio da qualidade espermática está relacionado ao aumento nos casos de infertilidade e maior procura por técnicas de fertilização *in vitro*; em animais de vida livre, a infertilidade pode, em longo prazo, levar a diminuição no número de indivíduos, o que mais adiante pode culminar em extinção de espécies. Entender os mecanismos envolvidos no prejuízo da capacidade reprodutiva e quais os contaminantes ambientais envolvidos neste processo. Além disso, é importante compreender como estes contaminantes afetam não só o indivíduo adulto, mas principalmente o organismo em desenvolvimento, de modo a traçar estratégias preventivas, uma vez que a literatura carece de dados sobre a toxicidade de nanoplásticos no desenvolvimento do sistema genital.

4. OBJETIVOS

Para tal, foram divididos em objetivo geral e objetivos específicos.

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a exposição ao NP-PS durante o período juvenil e puberal pode influenciar no desenvolvimento pós-natal dos testículos e afetar a qualidade espermática e hormonal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a exposição ao NP-PS durante os períodos juvenil e puberal afeta o desenvolvimento testicular, pela avaliação de parâmetros histopatológicos, morfométricos e dinâmica da espermatogênese no órgão;
- Avaliar a qualidade espermática a partir de sua vitalidade, motilidade, morfologia, maturação da cromatina e atividade mitocondrial após exposição ao NP-PS durante os períodos juvenil e puberal;
- Quantificar os níveis séricos de estradiol e testosterona após exposição ao NP- PS durante os períodos juvenil e puberal.

5 METODOLOGIA

O presente projeto possui apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (processo APQ-00221-22) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFTM) (parecer nº 9/2024/CEUA/PROPPG, Anexo I).

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 30 camundongos machos (*Mus musculus*), da linhagem C57BL/6 obtidos com 21 dias de idade (dia pós-natal, DPN 21). Estes animais foram obtidos do Biotério Central da UFTM, sendo transferidos para o novo ambiente, o Laboratório Multiusuário de Modelos Biológicos (LaMMoBi), onde foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n=15/grupo), sendo:

- Grupo Controle, que recebeu somente solução de PBS (Tampão fosfato-salino, pH 7,4) durante todo o período experimental;
- Grupo NP-1X, que recebeu NP-PS diluído em PBS na concentração de 0,1 mg/dia;
- Grupo NP-10X, que recebeu NP-PS diluído em PBS na concentração de 1 mg/dia.

As doses foram selecionadas a partir de uma estimativa da exposição ambiental humana (Yadav; Sethulekshmi; Shriwastav, 2022). Foi realizada uma conversão inter-espécie utilizando o método proposto por Nair e Jacob (2016, p. 27). Todos os grupos foram expostos via gavagem para garantir o consumo da dose (Xie *et al*. 2020; Jin *et al.*, 2021). A exposição ocorreu por 50 dias consecutivos a partir do DPN 22. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em racks ventilados com micro-isoladores, que possuíam sistema independente de insuflamento e exaustão de ar, sob temperatura controlada (23 ± 2ºC), e tiveram livre acesso à comida e água. O peso corporal foi aferido duas vezes por semana.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE POLIESTIRENO (NP-PS)

A solução contendo nanopartículas de poliestireno (NP-PS) foi fornecida e caracterizada em colaboração com a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP, USP). As partículas apresentaram raio hidrodinâmico médio de 180 nm e potencial zeta de -27 mV.

5.3 COLETA DOS MATERIAIS

Ao final do período experimental, os animais foram pesados, anestesiados com 12 microlitros de associação de xilazina e cetamina e submetidos à eutanásia por punção cardíaca. Foram coletados e pesados os testículos e epidídimos, os ductos deferentes (para coleta de espermatozoides) e sangue, os quais foram processados de acordo com a análise a ser realizada com cada material.

5.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS TESTÍCULOS

Os testículos (n=6/grupo) foram imersos em Methacarn (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por um período de 6h. Ao término da etapa de fixação, o Methacarn foi substituído por álcool 70%, onde as peças permaneceram até o processamento de rotina para inclusão em parafina. Os tecidos foram então seccionados a 5µm corados com hematoxilina e eosina (HE) para as análises descritas a seguir.

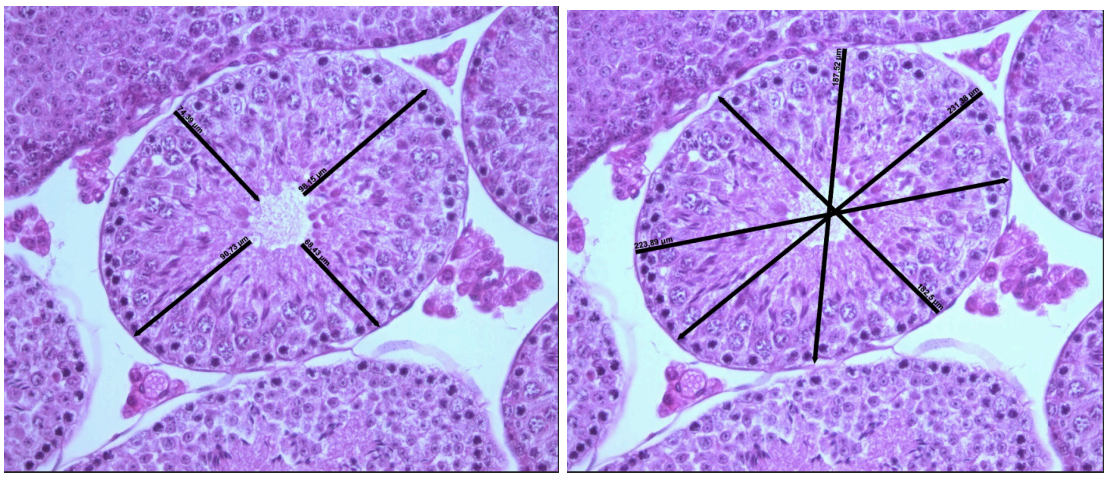
5.4.1 Avaliação Histopatológica

Estas avaliações foram realizadas conforme descrito por Siervo *et al*. (2015). Para a análise histopatológica testicular, foram avaliados cortes transversais do órgão com auxílio de microscópio de luz (aumentos de 100X, 200x e 400X). Foram analisadas todas as secções de túbulos seminíferos de um corte por animal, classificando-os em normal ou anormal. Os túbulos foram considerados anormais quando identificados: células acidófilas no epitélio seminífero ou luz tubular, células multinucleadas, espermátides retidas no compartimento basal, degeneração de tipos celulares, vacuolização do epitélio ou presença de células germinativas imaturas na luz.

5.4.2 Avaliação Morfométrica

Foram avaliados o diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio germinativo em todas secções de túbulos seminíferos no estágio IX da espermatogênese, por animal. Para tanto, foi utilizado um microscópio acoplado a um fotodocumentador, utilizando o aumento de 100X e um analisador de imagem (figura 8). (Siervo *et al.*, 2015).

Figura 8 - Ilustração esquemática da metodologia de análise histomorfométrica dos túbulos seminíferos.



À esquerda, demonstração do posicionamento do centro luminal e do traçado de eixos radiais para mensuração do diâmetro tubular, da área luminal e da espessura do epitélio seminífero. À direita, aplicação de múltiplos eixos radiais equidistantes, utilizados para obtenção de valores médios e padronização das medidas, minimizando vieses associados à orientação do corte histológico.

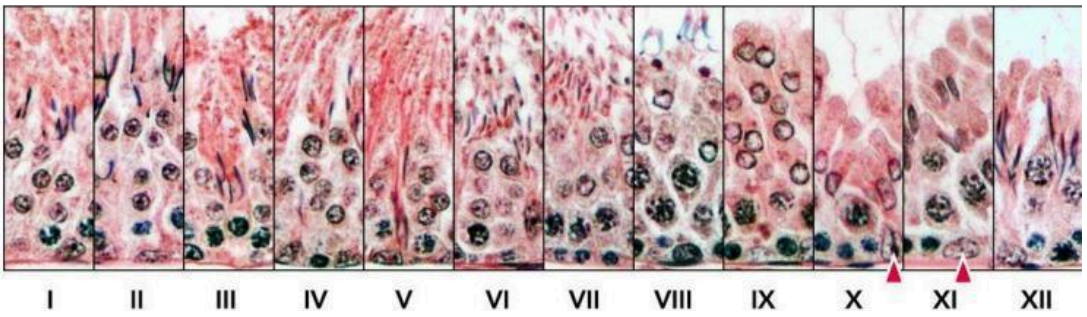
Fonte: elaboração própria, 2025.

5.4.3 Avaliação do Processo Espermatogênico

Para esta análise, todas as secções transversais de túbulos seminíferos dentro da normalidade, de um corte por animal foram avaliadas (Siervo *et al.*, 2015). Os túbulos foram classificados de acordo com os seguintes estágios da espermatogênese:

- Estágios I-VI: apresenta duas gerações de espermátides;
- Estágios VII-VIII: apresenta espermátides maduras localizadas na borda do lúmen;
- Estágios IX-XI: apresenta somente uma geração de espermátides;
- Estágio XII: apresenta espermatócito secundário.

Figura 9 – Estágios do epitélio seminífero em camundongo



Fonte: Adaptado de Hess *et al*. 1990.

5.5 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE ESPERMATOZOIDES

Imediatamente após a eutanásia, os ductos deferentes direitos e esquerdos foram removidos e colocados em solução de PBS aquecida a 37ºC. O conteúdo dos ductos foi lavado com o mesmo tampão aquecido, com auxílio de agulha fina e seringa. Os espermatozoides foram coletados em microtubo e processados conforme descrito a seguir.

5.5.1 Motilidade Espermática

Para a avaliação da motilidade espermática, uma alíquota (10 µL) da amostra (n=10/grupo) foi transferida para a câmara de Neubauer no momento da coleta. Em seguida foi observada sob microscópio de luz, em aumento na objetiva de 20× a 40× . Foram observados 100 espermatozoides, os quais foram classificados em duas categorias: móveis, quando apresentavam qualquer tipo de movimentação (independente de ser progressiva ou não), e imóveis, quando não apresentavam nenhum tipo de deslocamento ou vibração flagelar. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao total de células analisadas.

5.5.2 Vitalidade Espermática

Uma alíquota (n=8/grupo) da solução contendo espermatozoides foi adicionada ao corante eosina nigrosina no momento da coleta, que penetra a membrana plasmática de células mortas. A análise foi conduzida em microscópio de luz com aumento de 400×. Foram avaliados 100 espermatozoides por amostra, e a vitalidade foi determinada com base na cor das células: células transparentes foram considerados vivas, enquanto aqueles corados em rosa ou vermelho foram classificados como células mortas. Os resultados foram expressos

como a porcentagem de espermatozoides vivos e mortos em relação ao total de células contadas.

5.5.3 Avaliação da Atividade Mitocondrial Espermática

Para a avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides (n=8/grupo), foi utilizado o método descrito por Hrudka (1987), que utiliza o cromóforo DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto), o qual reage com a enzima citocromo C-oxidase presente nas mitocôndrias ativas da peça intermediária dos espermatozoides. Essa reação resulta na polimerização do DAB e posterior deposição de um produto amarronzado, visível apenas em mitocôndrias ativas. Todo o procedimento foi realizado sob proteção da luz para evitar a degradação do reagente.

Inicialmente, foi preparada uma solução de DAB na concentração de 1 mg/mL em tampão PBS (NaCl 150 mM, $Na_2 HPO_4$ 9,1 mM e $NaH_2 PO_4$ 1,7 mM, pH 7,4). Em seguida, uma alíquota da amostra de espermatozoides (20 µL) foi adicionada à solução de DAB na proporção de 1:3 (v/v). A mistura foi incubada a 37 °C por 1 hora, em banho-maria. Após a incubação, foram preparados esfregaços em lâminas histológicas, os quais foram deixados secar à temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas em solução de formaldeído a 10% diluída em PBS por 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas com PBS e deixadas novamente para secar em temperatura ambiente. A análise foi realizada por microscopia de luz, observando-se 100 espermatozoides por amostra, que foram classificados de acordo com a intensidade e extensão da coloração amarronzada na peça intermediária. Os resultados foram expressos em porcentagem de células pertencentes a cada classe.

5.5.4 Maturação da Cromatina Espermática

Para a avaliação da maturação da cromatina espermática, foi utilizado o método utilizado por Campos *et al.* (2023), baseado no corante azul de anilina, que possui afinidade pelas histonas associadas à cromatina do gameta. Espermatozoides imaturos, com altos níveis de histonas, são corados de azul escuro, enquanto espermatozoides maduros, ricos em protaminas, não apresentaram coloração significativa ou apresentaram coloração azul clara. Inicialmente, foi preparada uma solução a 4% de ácido acético em água destilada. Em seguida, o corante azul de anilina foi diluído nesta solução para obtenção de uma concentração final de 5% (500 mg de azul de anilina completados com solução de ácido

acético até 10 mL). A suspensão de espermatozoides coletados em PBS foi utilizada para a preparação de esfregaços em lâminas histológicas, que foram deixados para secar à temperatura ambiente (n=8/grupo).

As lâminas secas foram fixadas em solução de formol a 10% por 10 minutos, também em temperatura ambiente. Após a fixação, as lâminas foram lavadas com água destilada e submetidas à coloração em solução de azul de anilina a 5% por 5 minutos. Em seguida, foram novamente lavadas com água destilada e deixadas para secar à temperatura ambiente. As lâminas foram então montadas com lamínulas utilizando meio de montagem adequado. Por fim foi realizada a contagem de 100 espermatozoides por animal. As células foram classificadas em duas categorias: espermatozoides corados em azul escuro (indicando cromatina imatura) e espermatozoides não corados ou corados em azul claro (indicando cromatina madura). Os resultados foram expressos em porcentagem de células em cada categoria, corado, não corado e parcialmente corado.

5.6 AVALIAÇÃO HORMONAL

As análises hormonais foram realizadas por meio de kits comerciais da USCN Life Science (Wuhan, China), empregando a técnica de imunoadsorção enzimática (ELISA) por formato competitivo. Para tal, foram utilizados os kits específicos para estradiol e testosterona. Esse método baseia-se na competição entre o hormônio endógeno presente nas amostras e o hormônio marcado, ambos competindo pelos sítios de ligação de anticorpos específicos imobilizados na microplaca, permitindo a quantificação das concentrações hormonais.

5.6.1. Testosterona

O ensaio seguiu as instruções do fabricante. Inicialmente, as amostras e padrões foram preparados e adicionados aos poços, juntamente com o reagente de detecção primário. Após incubação a 37 °C, os poços foram lavados com solução de lavagem. Em seguida, foi adicionado o reagente secundário, contendo estreptavidina conjugada à peroxidase (HRP), que se ligou à biotina previamente incorporada. Após nova etapa de lavagens, acrescentou-se o substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB), que ao ser oxidado pela HRP produziu uma coloração azulada. Essa reação foi interrompida com a adição de solução ácida, promovendo a mudança da cor para amarela.

A intensidade da coloração foi determinada por meio de leitura em espectrofotômetro de microplacas a 450 nm. A curva-padrão foi construída a partir de concentrações conhecidas de testosterona, permitindo a interpolação dos valores obtidos nas amostras.

5.6.2 Estradiol

O ensaio foi conduzido adicionando-se às placas as amostras, padrões e controles, seguidos dos reagentes de detecção. Após incubação controlada, as placas foram lavadas repetidamente para remoção do material não ligado. Em seguida, adicionou-se o substrato cromogênico (TMB), cuja reação enzimática foi interrompida pela solução de parada. A leitura da absorbância foi realizada em leitora de microplacas a 450 nm. A concentração de estradiol foi determinada por interpolação em curva padrão construída a partir das diluições seriadas fornecidas pelo kit. Os resultados foram expressos em pg/mL.

5.7 ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias e normalidade de Shapiro-Wilk pelo software GraphPad Prism (Version 8). A depender da distribuição dos dados, foi realizado o teste de *one-way* ANOVA, com pós-teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, para comparação entre todos os grupos experimentais, utilizando o mesmo software. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

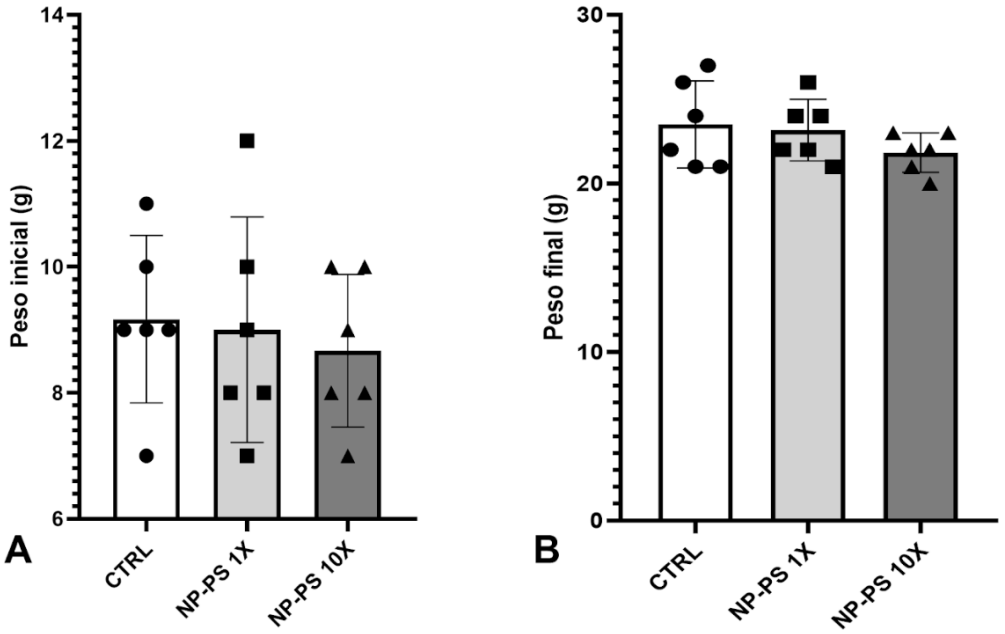
6 RESULTADOS

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos a partir das análises experimentais, descrevendo os efeitos da exposição aos nanoplásticos de poliestireno (NP-PS) sobre os parâmetros corporais e reprodutivos avaliados.

6.1 PESO CORPORAL, DOS TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS

A exposição ao NP-PS, independente da dose, não afetou o peso corporal dos camundongos (Figura 10). Os pesos dos testículos e epidídimos também não foram afetados pela exposição ao NP-PS (Tabela 1).

Figura 10 - Peso corporal de camundongos expostos ao NP-PS durante os períodos juvenil e puberal



Peso corporal inicial (A) e final (B) dos animais. Os valores são apresentados como médias ± desvio-padrão, com pontos representando os valores individuais de cada animal. One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p > 0,05$). Grupos: controle (CTRL), nanoplástico de poliestireno 0,1 mg/dia (NP-PS 1X) e nanoplástico de poliestireno 1 mg/dia (NP-PS 10X).

Tabela 1 - Pesos de testículos e epidídimos de camundongos expostos ao NP-PS durante os períodos juvenil e puberal

	CRTL	**NP-PS1X**	**NP-PS10X**
Testículo (g)	0.0924 ± 0.0144	0.1094 ± 0.0462	0.0947 ± 0.0158

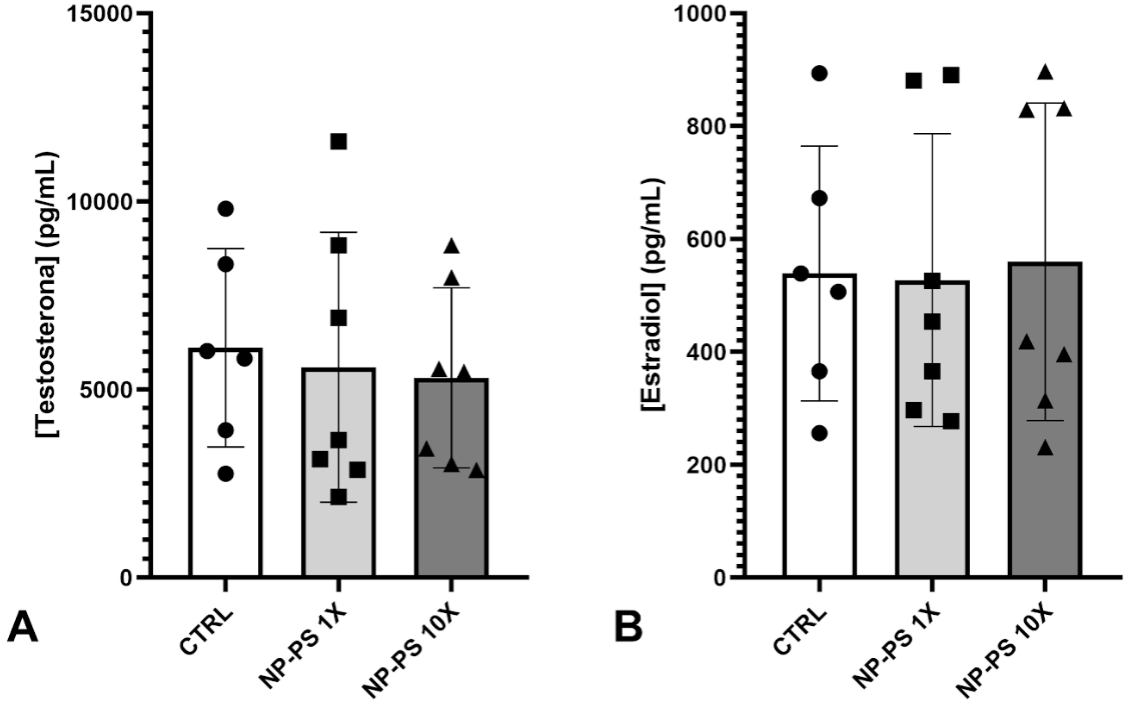
Epidídimo (g)	0.1155 ± 0.0194	0.1127 ± 0.0166	0.1043 ± 0.0257

Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA com pós-teste de Tukey, p>0,05. Grupos controle (CTRL), nanoplástico de poliestireno 0,1mg/dia (NP-PS 1X) e nanoplástico de poliestireno 1mg/dia (NP-PS 10X).

6.2. PARÂMETROS HORMONAIS

As concentrações séricas de testosterona (Figura 11A) e estradiol (Figura 11B) não diferiram entre os grupos experimentais.

Figura 11 - Concentrações séricas de testosterona e estradiol

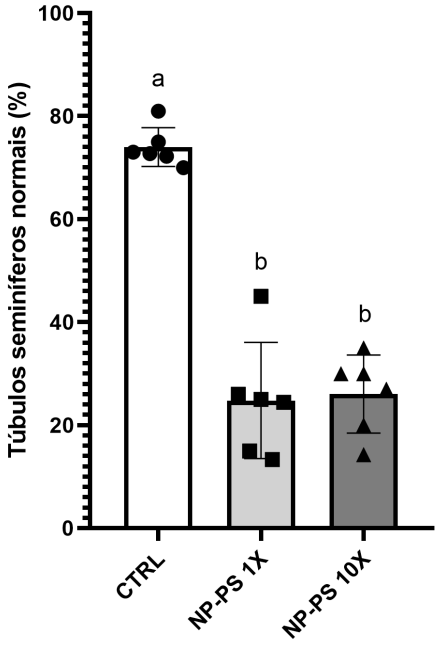


Concentrações séricas de testosterona (A) e estradiol (B) dos animais ao final do período de exposição. Os valores são apresentados como médias ± desvio-padrão, com pontos representando os valores individuais de cada animal. One-way ANOVA, (p > 0,05). Grupos: controle (CTRL), nanoplástico de poliestireno 0,1 mg/dia (NP-PS 1X) e nanoplástico de poliestireno 1 mg/dia (NP-PS 10X).

6.3 PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS

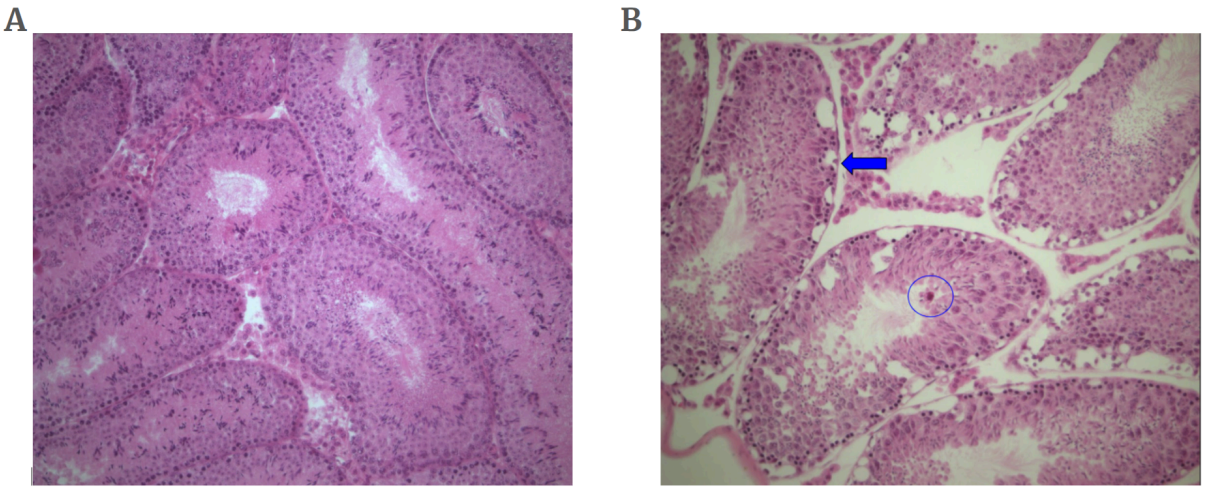
A exposição ao NP-PS nos períodos juvenil e puberal diminuiu a porcentagem de túbulos seminíferos normais (Figuras 12 e 13), independente da dose quando comparado ao grupo controle. As principais alterações observadas foram células arredondadas na luz dos túbulos seminíferos, vacuolização do epitélio e células acidófilas (Figura 13).

Figura 12 - Porcentagem de túbulos seminíferos dentro do aspecto de normalidade de camundongos expostos ao NP-PS durante os períodos juvenil e puberal



Os valores são apresentados como médias ± desvio-padrão, com pontos representando os valores individuais de cada animal. One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. a,b Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). Grupos controle (CTRL), nanoplástico de poliestireno 0,1mg/dia (NP-PS 1X) e nanoplástico de poliestireno 1mg/dia (NP-PS 10X).

Figura 13 - Comparação histológica dos túbulos seminíferos entre os grupos Controle e NP-PS1X

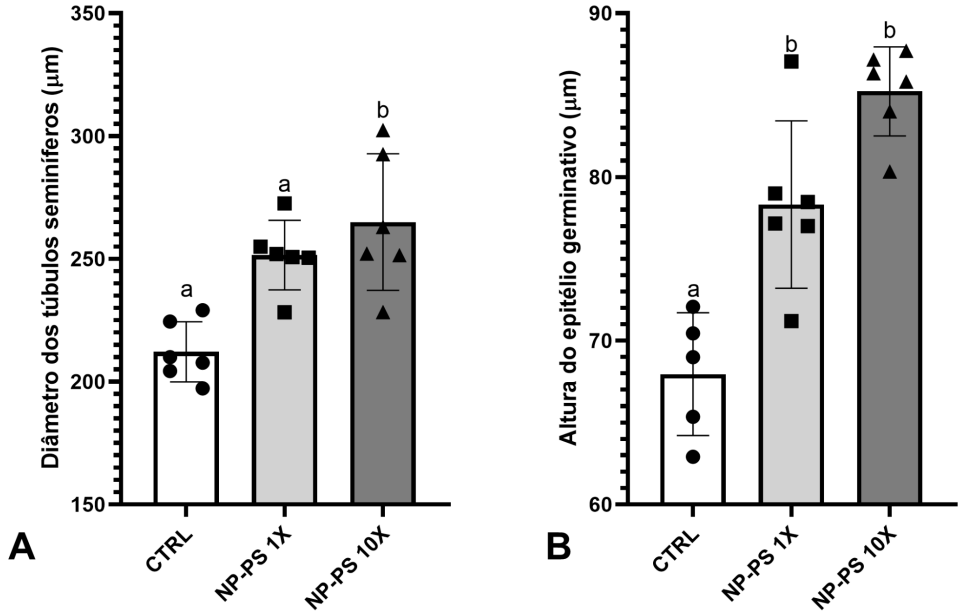


Fotomicrografias de túbulos seminíferos corados por hematoxilina e eosina (HE), aumento de 400×. **(A)** Túbulos seminíferos de animal do grupo Controle, evidenciando arquitetura preservada e integridade do epitélio seminífero, com presença apenas de espermatozoides no lúmen tubular. **(B)** Túbulos seminíferos de animal do grupo NP-PS1X, mostrando alterações morfológicas caracterizadas pela presença de célula acidófila (círculo) e vacuolização do epitélio seminífero (seta).

6.4 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA TESTICULAR

O diâmetro dos túbulos seminíferos mostrou-se aumentado nos animais que receberam a maior dose (Figura 13A), enquanto o grupo que recebeu a menor dose teve medidas similares ao grupo controle. Já a altura do epitélio germinativo foi maior em ambas as doses em relação ao controle (Figura 13B).

Figura 15 - Avaliação morfométrica dos testículos de camundongos expostos ao NP-PS durante os períodos juvenil e puberal



(A) Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm) e (B) altura do epitélio germinativo (µm). Os valores são apresentados como médias ± desvio-padrão, com pontos representando os valores individuais de cada animal. One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. a,b Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). Grupos controle (CTRL), nanoplástico de poliestireno 0,1mg/dia (NP-PS 1X) e nanoplástico de poliestireno 1mg/dia (NP-PS 10X).

6.5 AVALIAÇÃO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO

Os dados estão descritos na tabela 1. A exposição ao NP-PS, independentemente da dose, não alterou a dinâmica da espermatogênese em camundongos expostos.

Tabela 2 - Avaliação do processo espermatogênico de camundongos expostos ao NP-PS durante os períodos juvenil e puberal

	CTRL	**NP-PS 1X**	**NP-PS 10X**
Estágio I a VI (%)	68,83 ± 04,86	59,25 ± 25,70	51,06 ± 18,28

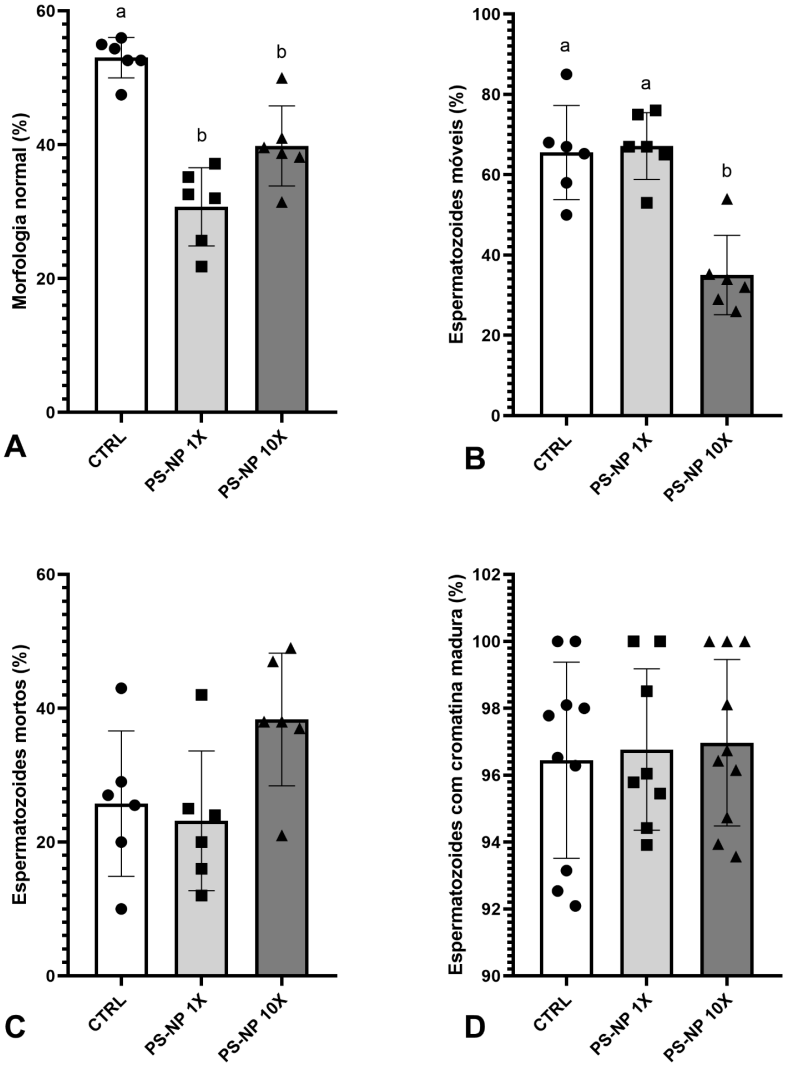
Estágios VII e VIII (%)	33,52 ± 28,65	33,75 ± 15,16	50,54 ± 26,03
Estágios IX a XI (%)	18,90 ± 11,32	24,06 ± 11,79	27,49 ± 19,59
Estágio XII (%)	01,00 ± 02,23	01,25 ± 02,79	02,22 ± 04,96

Valores expressos em média ± desvio padrão. ANOVA com pós-teste de Tukey, p>0,05. Grupos controle (CTRL), nanoplástico de poliestireno 0,1mg/dia (NP-PS 1X) e nanoplástico de poliestireno 1mg/dia (NP-PS 10X).

6.6 PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

A morfologia espermática foi alterada pela exposição ao NP-PS durante os períodos juvenil e puberal (Figura 16A). Independente da dose, a porcentagem de espermatozoides com morfologia normal foi diminuída em relação ao grupo controle. A porcentagem de espermatozoides móveis apresentou um decaimento pela exposição a maior dose de NP-PS em relação ao grupo controle. A motilidade espermática entre os grupos controle e NP-PS1X foi similar (Figura 16B). Já a vitalidade espermática (Figura 16C) e a porcentagem de espermatozoides com cromatina madura (Figura 16D) não foi alterada pela exposição ao NP-PS, independente da doses.

Figura 16 - Parâmetros espermáticos de camundongos expostos ao NP-PS durante os períodos juvenil e puberal

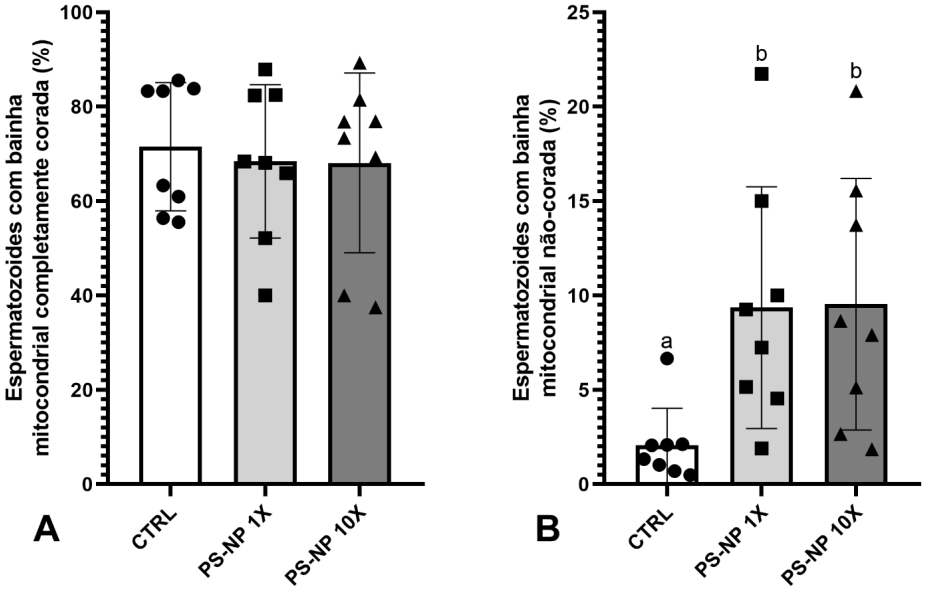


(A) Porcentagem de espermatozoides com morfologia dentro da normalidade. (B) Porcentagem de espermatozoides móveis. (C) Porcentagem de espermatozoides mortos. (D) Porcentagem de espermatozoides com cromatina madura. Os valores são apresentados como médias ± desvio-padrão, com pontos representando os valores individuais de cada animal. One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. a,b Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). Grupos controle (CTRL), nanoplástico de poliestireno 0,1mg/dia (NP-PS 1X) e nanoplástico de poliestireno 1mg/dia (NP-PS 10X).

6.6.1 Atividade Mitocondrial Espermática

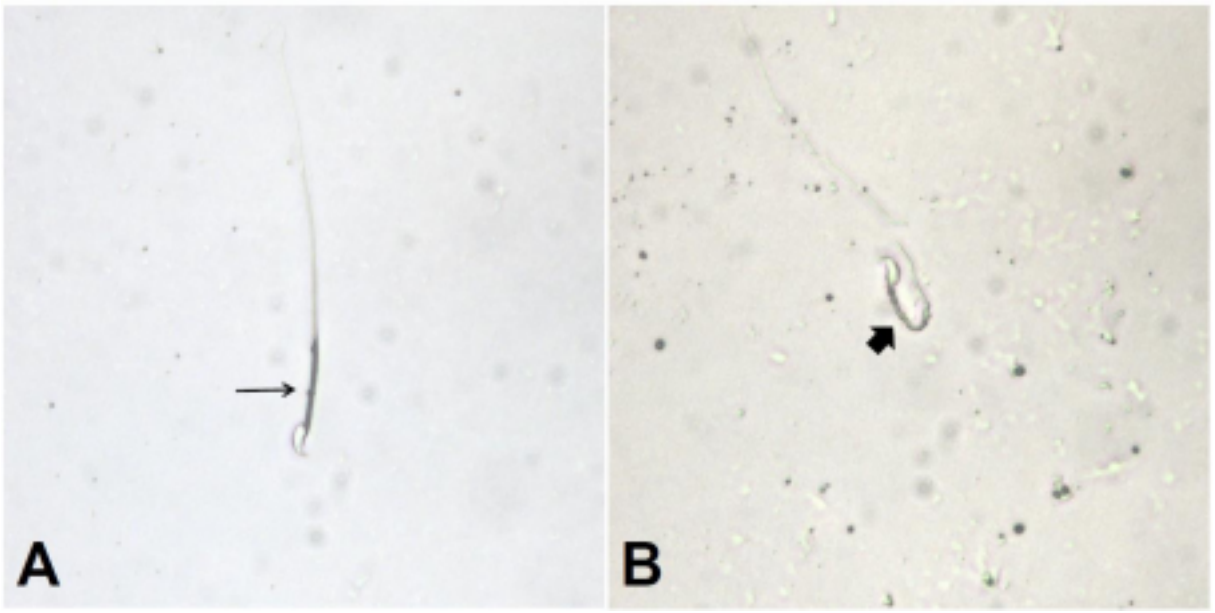
A exposição ao NP-PS não alterou a porcentagem de espermatozoides com peça intermediária totalmente corada (Figura 17A e 18A). No entanto, a porcentagem de células com peças intermediárias não-coradas foi maior nos grupos NP-PS 1X e NP-PS 10X em comparação ao grupo de controle (Figura 17B e 18B).

Figura 17 - Avaliação da atividade mitocondrial de espermatozoides por coloração com 3,3'- diaminobenzidina (DAB)



(A) Porcentagem de espermatozoides com peça intermediária totalmente corada, indicando plena atividade mitocondrial. (B) Porcentagem de espermatozoides com peça intermediária não-corada, representando mitocôndrias inativas. Os valores são apresentados como médias ± desvio-padrão, com pontos representando os valores individuais de cada animal. One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey. a,b Letras diferentes representam grupos estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$). Grupos controle (CTRL), nanoplástico de poliestireno 0,1mg/dia (NP-PS 1X) e nanoplástico de poliestireno 1mg/dia (NP-PS 10X).

Figura 18 - Atividade mitocondrial de espermatozoides por coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB)



(A) Imagem representativa de um espermatozoide de animal do grupo CTRL com a peça intermediária completamente corada pelo DAB, indicando atividade mitocondrial (seta fina) (B) Imagem representativa de um espermatozoide do grupo NP-PS10X com a peça intermediária não-corada pelo DAB, indicando ausência ou baixa atividade mitocondrial (seta grossa). Grupos controle (CTRL), nanoplástico de poliestireno 0,1mg/dia (NP-PS 1X) e nanoplástico de poliestireno 1mg/dia (NP-PS 10X).

7 DISCUSSÃO

A poluição por plástico tem levantado preocupações por sua persistência no ambiente e pela dispersão de micropartículas (Kumar *et. al*., 2025). Essa preocupação deve-se principalmente ao caráter bioacumulador destas partículas, e aos prejuízos já relatados em diferentes sistemas. A literatura mostra que os nanoplásticos podem interferir em processos celulares, causar desregulação hormonal e aumentar o estresse oxidativo, além de afetar a fertilidade (Ali *et. al*., 2024). Nesse sentido, é importante a compreensão dos efeitos da exposição ao NP em períodos críticos do desenvolvimento, como o período pós-natal.

Em relação ao peso corporal, o presente estudo não evidenciou diferença significativa entre os grupos expostos e não expostos. De acordo com Liu *et al*. (2023), que realizou uma meta-análise, não foi possível concluir que tanto o micro ou nanoplásticos são capazes de afetar o crescimento e o peso corporal, uma vez que os dados são inconclusivos e ou divergentes a depender da metodologia utilizada e da dose. Ainda em relação ao peso, não foram observadas diferenças significativas nos pesos dos testículos e dos epidídimos entre os grupos experimentais. Esse achado é consistente com o estudo de Li *et al*. (2022), no qual camundongos C57BL/6 expostos a nanoplásticos de poliestireno (50 nm) também não apresentaram alterações no peso desses órgãos. Esses resultados sugerem que, embora a exposição possa desencadear efeitos funcionais ou histológicos, o grau de dano não foi suficiente para impactar parâmetros ponderais.

Os dados morfométricos testiculares, que demonstraram aumento significativo no diâmetro dos túbulos seminíferos e na altura do epitélio germinativo, sugerem uma possível associação entre a exposição a nanoplásticos e alterações na arquitetura testicular, em comparação ao grupo controle. Esses achados estão em consonância com os resultados de (Fu *et al*., 2024; Lv *et al*., 2025), que, em estudos com nanopartículas de poliestireno de 50nm em camundongos em exposições de 75 a 50mg/kg, observaram acúmulo de nanoplásticos no tecido testicular, levando ao desencadeamento de estresse oxidativo e ferroptose em células da linhagem germinativa, culminando em alterações estruturais nos túbulos seminíferos. A redução significativa na proporção de túbulos seminíferos normais nos grupos que receberam ambas as doses de NP-PS está de acordo, em parte, ainda com os achados de (Fu *et al*., 2024; Lv *et al*., 2025). Nesse estudo, a exposição crônica a nanopartículas de poliestireno resultou em uma diminuição significativa da proporção de túbulos saudáveis, sugerindo um efeito potencialmente dose-dependente.

Evidências similares foram relatadas por Hu *et al*. (2024), que observaram, em ratos

pré-púberes expostos a NP-PS a partir de (PND21) expostos a 80 nm de PS-NPs em doses de 3-12 mg/kg/dia, tiveram alterações degenerativas, como vacuolização e desorganização do epitélio seminífero, levando à redução na proporção de túbulos com morfologia preservada. Esses achados podem indicar ruptura da barreira hematotesticular e desequilíbrio na população de células germinativas. De forma semelhante, Liu *et al*. (2025) relataram que camundongos C57BL/6 machos (10–12 semanas de idade), expostos a nanopartículas de poliestireno (60 nm, 20 mg/kg/dia) por 35 dias, apresentaram atrofia parcial dos túbulos seminíferos, demonstrando que mesmo em diferentes períodos de exposição, as NP-PS já são capazes de induzir alterações testiculares significativas.

Esse desequilíbrio, no entanto, não foi evidenciado na análise da dinâmica da espermatogênese. No estudo de Gao *et a*l. (2024), que utilizou nanopartículas de poliestireno (PS-NPs; 5 mg/kg/dia por 45 dias), observou-se uma redução no índice testicular, lesões na lâmina basal dos túbulos seminíferos e diminuição no número de espermatogônias. No entanto, os autores não apresentaram uma análise detalhada da distribuição percentual das diferentes fases do ciclo. Embora tenham sido identificadas alterações histológicas, incluindo a redução de espermatogônias e danos à integridade tubular, essas alterações podem não ter sido suficientes para modular o padrão cíclico do epitélio seminífero (Sharma *et al.* 2024).

Em relação aos parâmetros hormonais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações séricas de testosterona e estradiol entre os grupos expostos. Esses resultados indicam que, nas condições experimentais deste estudo, a exposição aos nanoplásticos de poliestireno não foi suficiente para promover desregulação hormonal sistêmica. Essa ausência de alteração pode estar relacionada ao período de exposição, uma vez que os animais foram avaliados em uma fase de desenvolvimento na qual o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal ainda se encontra em maturação. Durante essa janela crítica, os níveis de esteroides sexuais podem apresentar flutuações fisiológicas amplas, o que pode mascarar variações sutis induzidas por agentes externos (Kuiri-Hänninen; Sankilampi; Dunkel, 2014).

Além disso, é possível que os efeitos dos nanoplásticos nessa fase se concentrem em mecanismos locais, como estresse oxidativo e disfunção mitocondrial nas células germinativas, sem atingir o controle endócrino sistêmico. Embora estudos prévios com animais adultos relatem reduções significativas de testosterona após exposição a micro ou nanoplásticos (Jin *et al*., 2025; Clará *et al*., 2025), os resultados aqui observados sugerem que a resposta hormonal pode variar conforme a idade, o tempo de exposição e o estágio de desenvolvimento reprodutivo.

Nos espermatozoides os dados sugeriram uma disfunção mitocondrial, corroborando achados de estudos anteriores. Em espermatozoides humanos expostos a nanopartículas de poliestireno (PS-NPs; 50 nm), foi relatada uma redução semelhante na coloração com DAB, sugerindo disfunção mitocondrial associada ao estresse oxidativo mediado por espécies reativas de oxigênio (EROs) (Contino *et al*., 2023). Em camundongos, a exposição a micropartículas de poliestireno (PS-MPs) aumentou a produção de ROS e promoveu alterações na via Sirt1‑Pgc1α, comprometendo a atividade mitocondrial e, consequentemente, a motilidade espermática (Jin *et al*., 2025).

Os animais expostos a nanopartículas de poliestireno (NP-PS) apresentaram redução significativa na motilidade espermática e aumento na porcentagem de espermatozoides com morfologia anormal, especialmente no grupo exposto a dose de 1mg/dia. Esses achados estão em consonância com outros estudos da literatura, que descrevem um declínio nos parâmetros espermáticos associados à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo induzido pela exposição a micro- e/ou nanoplásticos. Clará *et al*. (2025) demonstraram que nanoplásticos (NPLs, <1 μm) podem aderir à membrana plasmática dos espermatozoides, resultando em redução significativa da motilidade, perda da integridade da membrana e comprometimento da reação acrossômica. Da mesma forma, Jin *et al*. (2025) relataram que as micropartículas de poliestireno (PS-MPs) alteram proteínas mitocondriais e acrossômicas essenciais (como Drp1, Fis1, Mfn1/2), provocando queda na motilidade por meio da desorganização do metabolismo energético. Além disso ressaltando a importância de investigações futuras em diferentes janelas do desenvolvimento.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste demonstram que a exposição ao nanoplástico de poliestireno (NP-PS) durante os períodos juvenil e puberal compromete aspectos importantes do desenvolvimento reprodutivo masculino. Embora o peso corporal não tenha sido alterado, foram observadas modificações histopatológicas e morfométricas significativas nos testículos, como a redução da proporção de túbulos seminíferos normais, aumento do diâmetro tubular e alterações na altura do epitélio germinativo. Apesar de a dinâmica geral da espermatogênese e os níveis séricos de testosterona e estradiol não ter apresentado diferenças estatisticamente significativas, os espermatozoides exibiram prejuízos em sua morfologia e motilidade, além de alterações na atividade mitocondrial, evidenciando impacto funcional relevante. Esses achados reforçam a sensibilidade do sistema reprodutor masculino à exposição a nanoplásticos em janelas críticas do desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, L. M.; TONIOLLI, R. A espermatogênese. **Ciência Animal**, Fortaliza, v. 33, n. 4, p. 101–121, out./dez. 2023.

ALI, N. *et al*. The potential impacts of micro- and nano-plastics on various organ systems in humans. **EBioMedicine**, Amsterdã, v. 99, 2024.

APONTE, P. M.; ROOIJ, D. G.; BASTIDAS, P. Testicular development in Brahman bulls**.** **Theriogenology**, Amsterdã, v. 64, n. 6, p. 1440–1455, 2005.

BORGES, B. R. *et al*. Microplastics as carriers of emissions in freshwater and soil. *In*: FRANÇA, D. C. de; SANTOS, M. P. dos (org.). **Microplásticos e nanoplásticos***: impactos e desafios ambientais*. [*S.l.*]: Atena Editora, 2022. p. 58–71.

BENOIT, G. *et al*. The anatomy of erection. **Surgical and Radiologic Anatomy**, Berlim, v. 9, n. 4, p. 263-272, 1987.

BOSSIO, S. *et al***.** Endocrine toxicity of micro-and nanoplastics, and advances in detection techniques for human tissues: a comprehensive review**. Endocrines**, Basileia, v. 6, n. 2, p. 23, 2025.

CAMPOS, P. G. de *et al*. **Histone post-translational modifications in the context of male infertility: potential biomarkers and therapeutic targets.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 21, p. 15954, 2023. DOI: 10.3390/ijms242115954.

CHEN, A. *et al*. Multiple transcriptome analyses reveal mouse testis developmental dynamics. **BMC genomics**, Londres, v. 25, n. 1, p. 395, 2024.

CLARÀ, A. *et al*. The impact of nanoplastics on mammalian reproductive function: an in vitro study with gametes, embryos and placental cells. ***Spanish Journal of Environmental Mutagenesis and Genomics***, Madri, v. 29, n. 1, p. 45, 2025.

CONTINO, M. *et al*. In vitro nano-polystyrene toxicity: metabolic dysfunctions and cytoprotective responses of human spermatozoa. **Biology**, Basileia, v. 12, n. 4, p. 624, 2023.

COUROT, M.; de RIVIERS, M. T. H.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. *In*: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (ed.). **The Testis**. . New York; London: Academic Press, 1970. cap. 6, p. 339–432.

CUI, R. *et al*. Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean Daphnia galeata **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 1, 21 set. 2017.

DENG, Y. *et al*. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. **Scientific reports**, Londres, v. 7, n. 1, p. 46687, 2017.

FANG, Q.; WANG, C.; XIONG, Y. Polystyrene microplastics induce male reproductive

toxicity in mice by activating spermatogonium mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdã,, v. 396, art. 111043, 1 jun. 2024.

FU, X. *et al*. Nrf2-mediated ferroptosis of spermatogenic cells involved in male reproductive toxicity induced by polystyrene nanoplastics in mice. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, Hangzhou, v. 25, n. 4, p. 307–323, 2024.

GAO, X. *et al*. Comparing the effects and mechanisms of exposure to polystyrene nanoplastics with different functional groups on the male reproductive system. **Science of The Total Environment**, Amsterdã, v. 922, art. 171299, 2024.

GAYLARDE, C. C.; BAPTISTA NETO, J. A.; FONSECA, E. M. da. Nanoplastics in aquatic systems-are they more hazardous than microplastics?. **Environmental Pollution**, Amsterdã, v. 272, p. 115950, 2021.

GE, R.-S.; LI, X.; WANG, Y. Leydig cell and spermatogenesis. *In*: MOLECULAR Mechanisms in Spermatogenesis. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 111–129.
35

GESAMP. **Fontes, destino e efeitos dos microplásticos no ambiente marinho**: uma avaliação global. Relatório nº 90, 2015. Londres: GESAMP, 2015.

GESELL, A. *et al*. **Human development and education**. Nova York: Harper & Brothers, 1947.

HESS, R. A., *et al*. "Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat." **Biology of reproduction**, Oxford,, 43.3 (1990): 517-524.

HESS, R. A. The efferent ductules: structure and functions. *In*: **The epididymis:** From molecules to clinical practice: A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens. Boston, MA: Springer US, 2002. p. 49-80.

HRUDKA, J. Cytoplasmic droplet and sperm maturation in the epididymis of normal and hypophysectomized rats. **International Journal of Andrology**, Hoboken, v. 10, n. 6, p. 809–828, 1987.

HUANG, Y. *et al*. Polystyrene nanoplastic exposure induces excessive mitophagy by activating AMPK/ULK1 pathway in differentiated SH-SY5Y cells and dopaminergic neurons in vivo. **Particle and Fibre Toxicology**, Londres, v. 20, n. 1, p. 44, 2023.

HUSSAIN, K. *et al*. Assessing the release of microplastics and nanoplastics from plastic containers and reusable food pouches: implications for human health. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 57, n. 26, p. 9782–9792, 2023. DOI: 10.1021/acs.est.3c01942.

HU, Y. *et al*. Protective effect of Cordycepin on blood-testis barrier against pre-puberty polystyrene nanoplastics exposure in male rats. **Particle and Fibre Toxicology**, Londres, v. 21, n. 1, p. 30, 2024.

JIN, H. *et al*. Microplásticos de poliestireno induziram toxicidade reprodutiva em camundongos machos. **Journal of dangerous materials**, Amsterdã, v. 401, 123430, 2021.

JIN, H. *et al*. Chronic exposure to polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity and decreased testosterone levels via the LH-mediated LHR/cAMP/PKA/StAR pathway. **Particle and Fibre Toxicology**, Londres, v. 19, n. 1, p. 13, 2022.

JIN, H. *et al*. Polystyrene microplastics induced spermatogenesis disturbances by disrupting mitochondrial function via regulating the Sirt1-Pgc1α signaling pathway in male mice**. Environmental Pollution**, Amsterdã, v. 364, art. 125364, 2025.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. *In*: JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. cap. 21, p. 411–426.

KARAPOZIS, V.; GIORDANI, C.; LOISELLE, R. *et al*. Plastics in aquatic environments: results of an international conference. **Folia Limnológica**, Cracóvia, v. 20, p. 1–12, 2021.

KENHUB. ***Testículos e epidídimo***. [S.l.]: Kenhub, 2023. Disponível em: https://www.kenhub.com/pt/study/testiculos-e-epididimo. Acesso em: 26 ago. 2025.

KIK, K.; BUKOWSKA, B.; SICIŃSKA, P. Polystyrene nanoparticles: sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. **Environmental Pollution**, Amsterdã, v. 262, art. 114297, 2020.

KUIRI-HÄNNINEN, T.; SANKILAMPI, U.; DUNKEL, L. **Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. Hormone research in paediatrics,** Basileia, v. 82, n. 2, p. 73-80, 2014.

KUMAR, N. Unseen dangers: the effects of micro- and nanoplastics on human reproductive health—a narrative review. **Recent Advances in Inflammation & Allergy Drug Discovery**, Sharjah, 2025.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the “periodic acid-fuchsin sulfurous acid” technique. ***American Journal of Anatomy***, Hoboken, v. 90, n. 2, p. 167–215, mar. 1952. DOI: 10.1002/aja.1000900202.

LEBRETON, L.; ANDRADY, A. Future scenarios for global plastic waste generation and disposal. **Palgrave Communications**, Londres, v. 1, art. 6, 2019.

LI, D. *et al*. **Polystyrene nanoparticles enhance the adverse effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on male reproductive system in mice**. Ecotoxicology and environmental safety, v. 245, p. 114104, 2022.

LIANG, B. *et al*. Underestimated health risks: polystyrene micro-and nanoplastics jointly induce intestinal barrier dysfunction by ROS-mediated epithelial cell apoptosis. **Particle and fibre toxicology**, Londres, v. 18, n. 1, p. 20, 2021.

LIU, W. *et al*. Toxicological effects of micro/nano-plastics on mouse/rat models: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Public Health**, Lausanne, v. 11, art. 1103289, 2023.

LIU, Y. *et al*. Exposure to polystyrene nanoplastics impairs sperm metabolism and pre-implantation embryo development in mice. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 13, art. 1562331, 2025.

LUO, S. *et al*. Global trends in semen quality of young men: a systematic review and regression analysis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, Londres, v. 21, n. 1, art. 90, 2023.

LU, C. *et al*. Microplastics cause reproductive toxicity in male mice through inducing apoptosis of spermatogenic cells via p53 signaling. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdã, v. 179, p. 113970, 2023.

LV, J. *et al*. Internalized polystyrene nanoplastics trigger testicular damage and promote ferroptosis via CISD1 downregulation in mouse spermatocyte**. Journal of Nanobiotechnology**, Londres, v. 23, n. 1, p. 537, 2025.

MAGALHÃES, L. **Espermatogênese:** toda matéria. [S.l.], [s.d.]. Disponível em: https://www.todamateria.com.br/espermatogenese Acesso em: 02 abr. 2024.

MARGOLIN, G. *et al*. Integrated transcriptome analysis of mouse spermatogenesis. **BMC genomics**, Londres, v. 15, n. 1, p. 39, 2014.

MIYATA, H. *et al*. Development of functional spermatozoa in mammalian spermiogenesis. **Development,** Cambridge, v. 151, n. 14, dev202838, 2024.

MOORE, K. L. *et al*. **Anatomia orientada para clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

MOORE, K. L. *et al*. **The developing human:** clinically oriented embryology. 10. ed. Filadélfia: Elsevier, 2015.

MONTENEGRO, R. S. P.; SERFATY, M. E. Aspectos gerais do poliestireno. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 16, p. 123–136, 2002.

NICCOLAI, E.; COLZI, I.; AMEDEI, A. Microplastics and their effects on the immune system and microbiota: state of the art and future perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, Basileia, v. 24, n. 20, p. 1–28, 2023.

NAIR, A. B.; JACOB, S.. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**, Bengaluru, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

OISETH, S. *et al*. **Fisiologia pré-natal e pós-natal do recém-nascido**. Palestra, 12 jul. 2022. PAWLINA, W. *Ross* ***Histologia: texto e atlas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

ON REPRODUCTIVE. Biologic Markers of Testicular Function**.** *In*: BIOLOGIC Markers

in Reproductive Toxicology. [S. l.]: National Academies Press (US), 1989.

PICUT, C. A. *et al*. Postnatal development of the testis in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 43, n. 3, p. 326–342, 2015.

PLASTICS EUROPE. **Plastics – the facts 2022**: an analysis of European plastics production, demand and waste data. Bruxelas: PlasticsEurope, 2022.

RAKOFF-NAHOUM, S. *et al*. Analysis of gene–environment interactions in postnatal development of the mammalian intestine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, D.C., v. 112, n. 7, p. 1929-1936, 2015.

RIGO, G. *et al*. EFFECT OF NANOPLASTICS ON DIFFERENT BIOLOGICAL SYSTEMS. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, São Paulo, v. 19, n. 10, p. 1-16, 2025.

RINALDI, V. D. *et al*. An atlas of cell types in the mouse epididymis and vas deferens. ***eLife***, Cambridge, v. 9, art. e55474, 2020.

RODRIGUES, M. **O plástico e a história**. [S.l.]: Rodoplast, 2024.

SCHMIDT, M. *et al*. **The postnatal development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the mouse**. International journal of developmental neuroscience, v. 21, n. 3, p. 125-132, 2003.

SHARMA, K.; SHARMA, A.; BHATNAGAR, Pr.. Combined effect of polystyrene nanoplastic and di-n-butyl phthalate on testicular health of male Swiss albino mice: analysis of sperm-related parameters and potential toxic effects. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 31, n. 16, p. 23680-23696, 2024.

SHEN, T. *et al*. Effects of microplastic (MP) exposure at environmentally relevant doses on the structure, function, and transcriptome of the kidney in mice. **Molecules**, Basileia, v. 28, n. 20, p. 7104, 2023.

SIERVO, G. E.M.L. *et al*. Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: influence of lipid peroxidation but not testosterone. **Toxicology**, Amsterdã, v. 330, p. 1-8, 2015..

TANAKA, H.; BABA, T. Gene expression in spermiogenesis**. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, Heidelberg, v. 62, n. 3, p. 344–354, 2005.

THUMFART, K. M.; MANSUY, I. M. What are Sertoli cells? Historical, methodological, and functional aspects. **Andrology**, Hoboken, v. 11, n. 5, p. 849–859, 2023.

VERGOUWEN, R. P. F. A. *et al*. ***Postnatal development of testicular cell populations in mice.*** **Reproduction**, Cambridge, v. 99, n. 2, p. 479-485, 1993.

WANG, X. *et al*. Cytotoxicity and pro-inflammatory effect of polystyrene nano-plastic and micro-plastic on RAW264. 7 cells. **Toxicology**, Amsterdã, v. 484, p. 153391, 2023.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M.; MITCHELL, S. C. Plastic contamination of the food chain: A threat to human health? **Maturitas**, Amsterdã, v. 115, p. 64-68, 2018.

WEI, Y. *et al*. Polystyrene microplastics disrupt the blood-testis barrier integrity through ROS-mediated imbalance of mTORC1 and mTORC2. **Environmental Pollution**, Amsterdã, v. 289, art. 117904, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 6. ed. Geneva: WHO Press, 2021

YADAV, H.; SETHULEKSHMI, S.; SHRIWASTAV, A. Estimation of microplastic exposure via the composite sampling of drinking water, respirable air, and cooked food from Mumbai, India. **Environ Res**; Amsterdã, v. 214, pt. 1, 113735, nov. 2022. Doi: 10.1016/j.envres.2022.113735.

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

ZHENG, T.; YUAN, D.; LIU, C. Molecular toxicity of nanoplastics involving in oxidative stress and desoxyribonucleic acid damage. **Journal of Molecular Recognition**, Hoboken, v. 32, n. 11, p. e2804, 2019.

ZHANG, Y. *et al*. Reproductive toxicity of microplastics in female mice and their offspring through the induction of oxidative stress. **Environmental Pollution, Barkin-Essex**, Amsterdã, v. 327, art. 121482, 2023.

ZOLOTOVA, N. *et al*. Harmful effects of the microplastic pollution on animal health: a literature review. **PeerJ**, San Francisco, v. 10, p. e13503, 2022.

ZORZETTO, J. C. **Avaliação dos efeitos da inalação crônica de cocaína crack na espermatogênese de camundongos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) -- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ANEXO A - PARECER DO CEUA

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Comissão de Ética no Uso de Animais
R. Conde Prados, nº 191 - Bairro Abadia Uberaba/MG CEP 38025-260
(34) 3700-6802 E-mail: ceua@uftm.edu.br

Uberaba, 19 de abril de 2024

PARECER Nº **9/2024/CEUA/PROPPG**
PROCESSO Nº 23085.001746/2024-29
INTERESSADO: GLAUCIA ELOISA MUNHOZ DE LION SIERVO
ASSUNTO: **Parecer técnico: Influência de nanoplásticos de poliestireno sobre o desenvolvimento reprodutivo pós-natal de camundongos machos**

Certificamos que a proposta intitulada **"Influência de nanoplásticos de poliestireno sobre o desenvolvimento reprodutivo pós-natal de camundongos machos"**, registrada com o **23085.001746/2024-29**, sob a responsabilidade de Gláucia Eloisa Munhoz de Lion Siervo – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de **19-04-2024.** Após a conclusão dos experimentos pilotos e emissão de capacitação específica, esses comprovantes devem ser inseridos no processo para que sejam validados pela coordenação/secretaria, a fim de que a quantidade restante de animais possa ser liberada.

Finalidade	Projeto Piloto
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	3
Peso/idade	Indiferente
Gênero	Indiferente
Origem	Biotério Central da UFTM
Treinamento específico dos colaboradores	- Beatriz Teixeira de Oliveira; - Gabriel Magalhães Oliveira Rigo; - Cristiana Livramento Oliveira Pinto.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/05/2024 a 11/05/2027
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	45
Peso/idade	Não se aplica/21 dias
Gênero	Machos
Origem	Biotério Central da UFTM

Segue abaixo a relação de todos os envolvidos e as respectivas funções no referido projeto:

Responsável	**Funções no projeto**
Gláucia Eloisa Munhoz de Lion Siervo	Supervisão de todas as atividades envolvendo animais vivos e amostras biológicas, incluindo o estudo-piloto; supervisão de gavagem; realização dos procedimentos

	de anestesia, eutanásia e necrópsia; coleta e armazenamento de amostras biológicas e supervisão dos ensaios experimentais com as amostras biológicas.
Colaboradores	**Funções no projeto**
Heloisa Helena Vilela Costa	Realização de eutanásia e necrópsia; supervisão dos ensaios experimentais com as amostras biológicas.
Nicoly Caixeta Gonçalves	Acompanhar os discentes com menos experiência em todas as atividades executadas; gavagem; aferição dos pesos dos animais; eutanásia e necrópsia e realização dos ensaios com amostras biológicas.
Beatriz Teixeira de Oliveira	Acompanhar todas as atividades executadas; gavagem sob supervisão e após treinamento específico; aferição dos pesos dos animais após treinamento; acompanhar a eutanásia e necrópsia e realização dos ensaios com amostras biológicas sob supervisão.
Gabriel Magalhães Oliveira Rigo	Acompanhar todas as atividades executadas; gavagem sob supervisão e após treinamento específico; aferição dos pesos dos animais após treinamento; acompanhar a eutanásia e necrópsia e realização dos ensaios com amostras biológicas sob supervisão.
Cristiana Livramento Oliveira Pinto	Acompanhar todas as atividades executadas; gavagem sob supervisão e após treinamento específico; aferição dos pesos dos animais após treinamento; acompanhar a eutanásia e necrópsia e realização dos ensaios com amostras biológicas sob supervisão.

Rafael Destro Rosa Tiveron
Vice-coordenador da CEUA/UFTM

Documento assinado eletronicamente por **RAFAEL DESTRO ROSA TIVERON**, **Coordenador(a) da Comissão de Ética no Uso de Animais Substituto(a)**, em 22/04/2024, às 09:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1237731** e o código CRC **742284D8**.