



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ DUQUE DE CAXIAS
PROFESSOR GERALDO CIDADE**



Anne Raissa Melo Santos

**PLASTIFICANTE DEHP (DI-ETILHEXIL FTALATO) COMO DESREGULADOR
ENDÓCRINO DO METABOLISMO MATERNO DURANTE PERÍODO DA LACTAÇÃO**

Duque de Caxias

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ DUQUE DE CAXIAS
PROFESSOR GERALDO CIDADE**



Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas: Biotecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Orientadora: Ana Paula Santos da Silva de Oliveira

Duque de Caxias
2023

**PLASTIFICANTE DEHP (DI-ETILHEXIL FTALATO) COMO DESREGULADOR
ENDÓCRINO DO METABOLISMO MATERNO DURANTE PERÍODO DA LACTAÇÃO**

Anne Raissa Melo Santos

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas: Biotecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia.

Orientadora: Ana Paula Santos da Silva de Oliveira

Aprovada em ____ de _____ de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a.Dr^a. Ana Paula Santos da Silva de Oliveira (Orientadora)
Professora Adjunta Campus UFRJ Duque de Caxias

Prof^a.Dr^a. Carolina Alvares da Cunha de Azeredo Braga (Membro interno da banca)
Professora Adjunta Campus UFRJ Duque de Caxias

Prof^a.Dr^a.Carla Soares de Lima Prieto (Membro externo da banca)
Professora Adjunta do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ- Unidade Realengo)

Prof^o.Dr^o. William Corrêa Tavares (Revisor)
Professor Adjunto Campus UFRJ Duque de Caxias

Agradecimentos

Agradeço a Deus, primeiramente.

A todos que me acompanharam e aconselharam durante todo o caminho. Em especial à Thayná Macario por toda orientação, por todas as risadas e lágrimas e pelo tanto que aprendi em bancada.

Agradeço a toda minha família que sempre esteve ao meu lado, à minha mãe Stella Melo, meu pai Alejandro Corbacho, meu padrasto Antônio Lavigne, minha avó Cleide Ribeiro, minha tia Stella Maris, Mariana Ribeiro, Luiz Santiago. Por sempre acreditarem, apoiarem e me ajudarem, muito obrigada.

Às minhas amigas durante a graduação que levarei para vida toda, Isabel Garcia e Lorena Rezende.

A todos do laboratório que me ajudaram e estiveram comigo nas dificuldades e nos momentos felizes, em especial aos técnicos do laboratório Numpex-Bio Xerém, Brunno Verçoza, Aline de Luna, Fernanda Ferrão, Simone Santos, Daniel Azolin e aos amigos do laboratório, Jairo Dominguez, Sabrina de Oliveira, Luana Pereira, Vitória Emily Oliveira, Marcos Braga, Yuri Barbosa, Joice Ferreira.

Ao laboratório Endocrinologia Experimental - LEEEx, e ao Laboratório de Fisiologia Endócrina Doris Rosenthal (IBCCF), do Centro de Ciências da Saúde/UFRJ.

A Prof^a Dr^a Ana Paula Santos, pela orientação, ensinamento, cuidado, apoio e todo carinho durante o meu caminho na graduação.

À banca avaliadora e ao revisor, por aceitar meu convite.

A PIBIC-CNPq, pelo financiamento ao longo do projeto.

RESUMO

O DEHP (di-etilhexil ftalato) é um ftalato, da classe dos plastificantes e se encontra aderido a diversos produtos do dia-a-dia, como em brinquedos, embalagens de alimentos, materiais como policloreto de vinila (PVC), dentre outros. Por não se ligar covalentemente ao material aderido, pode se desprender facilmente do meio, contaminando-o, sendo considerado um desregulador endócrino. A exposição ao ftalato pode ocorrer por inalação, por absorção dermal, via oral e recentemente tem-se sugerido sua passagem pelo leite materno. A lactação surge como um período de susceptibilidade, uma vez que consiste em grande demanda energética e com modificações fisiológicas maternas para adaptação ao momento de amamentação. Dessa forma, o objetivo do trabalho consiste em investigar efeitos da exposição ao DEHP sobre o metabolismo e a homeostase glicêmica durante o período da lactação em ratas lactantes Wistar fêmeas. A metodologia dividiu as mães lactantes (n=9) em três grupos (3 ninhadas/grupo com 6 filhotes machos cada): i) grupo controle - mães, com exposição ao DEHP pelo método de gavagem oral, com veículo (óleo de sésamo); ii) grupo baixa dose - mães expostas com 100 mg/kg/dia de DEHP e iii) grupo de alta dose - mães expostas com 500 mg/kg/dia de DEHP. No final do tratamento, as mães e metade da prole (n=27) PN21 (Pós nascimento dia 21) foram eutanasiadas para análises. Nas mães, a glicemia se mostrou aumentada no grupo 500 mg/Kg/dia e 100 mg/Kg/dia (+38,1% e +31,7%). Os níveis de colesterol também se mostraram aumentados em 156,8% no grupo 500 mg/Kg/dia. Em relação aos filhotes, houve menor ganho de massa corporal (-15,4%) e menor peso relativo do TAB (Tecido adiposo branco) (-37,3%) nos grupos das mães 500 mg/Kg/dia. Sugere-se, por sua vez, interferência do DEHP na produção do leite materno, o que possivelmente diminuiria a disponibilidade nutricional e energética para a prole e poderia justificar o comprometimento do DEHP no desenvolvimento dos filhotes. Portanto, o DEHP pode estar interferindo na homeostase glicêmica e lipídica das ratas no período lactacional, além de comprometer o desenvolvimento saudável da prole.

Palavra-chave: Contaminante ambiental, leite materno, período de susceptibilidade, programação metabólica

ABSTRACT

The DEHP (di-ethylhexyl phthalate) is an extensive phthalate used as a plasticizer in many products, especially in toys, food packaging, and materials such as polyvinyl chloride (PVC). Because DEHP is noncovalently bonded to plastics, it will leach out of these products and come into contact with the environment contaminating it. In addition, the DEHP is classified as an endocrine disruptor. Phthalate exposure can occur through inhalation, dermal, and oral. Besides, recently it has been suggested its passage through breast milk. Lactation emerges as a period of susceptibility since it consists of great energy demands and maternal physiological changes to adapt to the moment of breastfeeding. Thus, the objective of this work is to investigate the effects of exposure to DEHP in female Wistar lactating rats, on metabolism and glycemic homeostasis during lactation. The methodology divided lactating mothers (n=9) into three groups (3 litters/group with 6 male pups each): i) control group - mothers exposed to DEHP by oral gavage, with vehicle (sesame oil); ii) low dose group - mothers exposed to 100 mg/kg /day of DEHP; and iii) the high-dose group - mothers exposed to 500 mg/kg/day of DEHP. At the end of treatment, mothers and half of the offspring (n=27) PN21 were euthanized for analyses. In mothers, glycemia was increased in the 500 mg/Kg/day and 100 mg/Kg/day groups (+38.1% and +31.7%). Cholesterol levels were also increased by (+156.8%) in the 500 mg/Kg/day group. In respect of the pups, there was a lower body mass gain of (-15.4%) and a lower relative WAT (White adipose tissue) weight of (-37.3%) in the groups of mothers receiving 500 mg/Kg/day. It is suggested that the interference of DEHP in the production of breast milk would possibly reduce the nutritional and energy availability for the offspring and could justify the impairment of DEHP in the development of the offspring. Therefore, DEHP may be interfering with the glycemic, lipid homeostasis of female rats during the lactational period and compromising the healthy development of the offspring.

Keyword: Environmental contaminant, breast milk, period of susceptibility, metabolic programming

Lista de abreviaturas

AKT- Proteína quinase B
AKT-p- Proteína quinase B fosforilada
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA- Bisfenol A
BPF- Bisfenol F
C/EBP α - Proteínas de ligação ao amplificador de CCAAT
CT- Colesterol total
CYP7A1- colesterol 7-alfa-monooxigenase
DBP- Butil-benzil ftalato
DE- Desreguladores endócrinos
DEHP- Di-2 etilhexil ftalato
DOHaD- do inglês "*Developmental origins of health and disease*"
ELISA- Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima
FoxO1- Fator de transcrição do inglês "Forcem box 01"
GLUT4- Transportador de glicose 4
HED- Dose estimada equivalente em humanos
HOMA-IR (resistência à insulina)
HOMA- β (capacidade secretória de insulina pelas células β pancreáticas)
Huh7- Células de hepatócitos humanos
LDL- Lipoproteína de baixa densidade
LXR α - Receptor nuclear sensível a lipídios
MECPP- mono-(2-etil-5-carboxipentil) ftalato
MEHHP- mono-(2-etil-5-hidroxi hexil) ftalato
MEHP- Monodi-etilhexil ftalato
MEOHP- mono-(2-etil-5-oxo hexil) ftalato
NOAEL- Mínima dosagem sem efeitos adversos
PI3K- Fosfatidilinositol 3 - quinases
PN21- Pós nascimento dia 21
PPAR α - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma α
PPAR γ - Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma γ
PVC- Policloreto de vinila
RIPA- Tampão para ensaio de radioimunoprecipitação
SNC- Sistema Nervoso Central
SRBP1- Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1
TAB- Tecido adiposo branco
TBS- Tampão tris salino
TDI- Dose tolerável diária
TGL- Triglicérides
TTBS- Tampão tris salino com tween
TWEEN- Polissorbato
UE- União Europeia
USFDA- Agência federal do inglês "*Food and Drug Administration*"
VLDL-C- Lipoproteína de muita baixa densidade

Lista de Figuras

Figura 1: Substâncias químicas que funcionam como desreguladores endócrinos.....	11
Figura 2: Principais mecanismos de ação dos desreguladores endócrinos.....	12
Figura 3: Estrutura química do DEHP.....	13
Figura 4: Vias de metabolização do DEHP em humanos.....	16
Figura 5: Representação da premissa DOHaD na gestação	18
Figura 6: Diferenças anatômicas da glândula mamária e nas etapas da lactação entre espécies.....	21
Figura 7: Modelo esquemático da metodologia.....	25
Figura 8: Evolução e ganho de massa corporal das ratas lactantes.....	30
Figura 9: Ingestão e coeficiente alimentar das ratas lactantes.....	31
Figura 10: Homeostase glicêmica das ratas lactantes.....	32
Figura 11: Peso relativo do TAB e hepático das ratas lactantes.....	33
Figura 12: Perfil lipídico das ratas lactantes.....	34
Figura 13: Expressão de AKT e AKT-p hepática das ratas lactantes.....	35
Figura 14: Expressão de AKT e AKT-p do tecido adiposo das ratas lactantes.....	36
Figura 15: Ganho e evolução de massa corporal, peso relativo do fígado e hepático de PN21.....	37
Figura 16: Modelo esquemático dos resultados e discussão perfil materno e filhotes.....	43

Índice

RESUMO	4
ABSTRACT	5
Lista de abreviaturas	6
Lista de figuras	7
1.Introdução	10
1.1 Contaminantes ambientais como desreguladores endócrinos.....	10
1.1.2 Plastificantes.....	12
1.1.3 Ftalato DEHP.....	13
1.2 Hipótese DOHaD.....	16
1.2.1 DEHP e metabolismo materno.....	18
2.Objetivos	22
2.1 Objetivos específicos	22
3.Metodologia	23
3.1 Modelo experimental.....	23
3.2 Avaliação murinométricas e nutricionais.....	25
3.3 Pesagem relativa do tecido hepático e do tecido adiposo branco.....	25
3.4 Avaliação da homeostase glicêmica.....	25
3.5 Avaliação do perfil lipídico.....	26
3.6 Quantificação proteica por <i>Western Blotting</i>	26
3.7 Avaliação manométrica da prole ao desmame.....	28
3.8 Análise estatística.....	28

4.Resultados	29
4.1 Perfil murinométrico materno.....	30
4.2 Perfil glicêmico materno.....	33
4.3 Perfil lipídico materno.....	34
4.4 Quantificação proteica AKT e AKT-p materna.....	35
4.5 Perfil murinométrico filhotes PN21.....	37
5.Discussão	38
6.Conclusão	43
7.Referências	45

1. Introdução

1.1 Contaminantes ambientais como desreguladores endócrinos

Com a industrialização, uma ampla gama de materiais foram desenvolvidos para fazer parte das práticas do dia-a-dia antropogênico, e muitos deles com a presença de contaminantes ambientais. Esses contaminantes são substâncias que podem funcionar como aditivos e se aderem a diversos materiais. Pode-se citar produtos farmacêuticos, de cuidados diários, brinquedos, produtos de higiene, e inúmeros outros (Triantafyllou et al 2007, Guo et al 2019). Ainda, eles podem ser desreguladores endócrinos (DEs) e compreender diversas substâncias químicas, como solventes industriais, plastificantes, pesticidas e agentes farmacêuticos, como mostra na FIGURA 1, sendo alguns desses compostos de estrutura similar ao hormônio como 17- β -estradiol (Martín-Pozo et al. 2019). Os químicos desreguladores endócrinos são definidos como substâncias exógenas ou misturas que causam impactos no funcionamento dos organismos, influenciando o sistema endócrino. Seus efeitos podem incluir a capacidade de imitar ou inibir hormônios normais, por se ligarem aos seus receptores, interrompendo a sinalização endócrina esperada, assim como outros efeitos como os apresentados na FIGURA 2 (Tapia-Orozco et al. 2016).

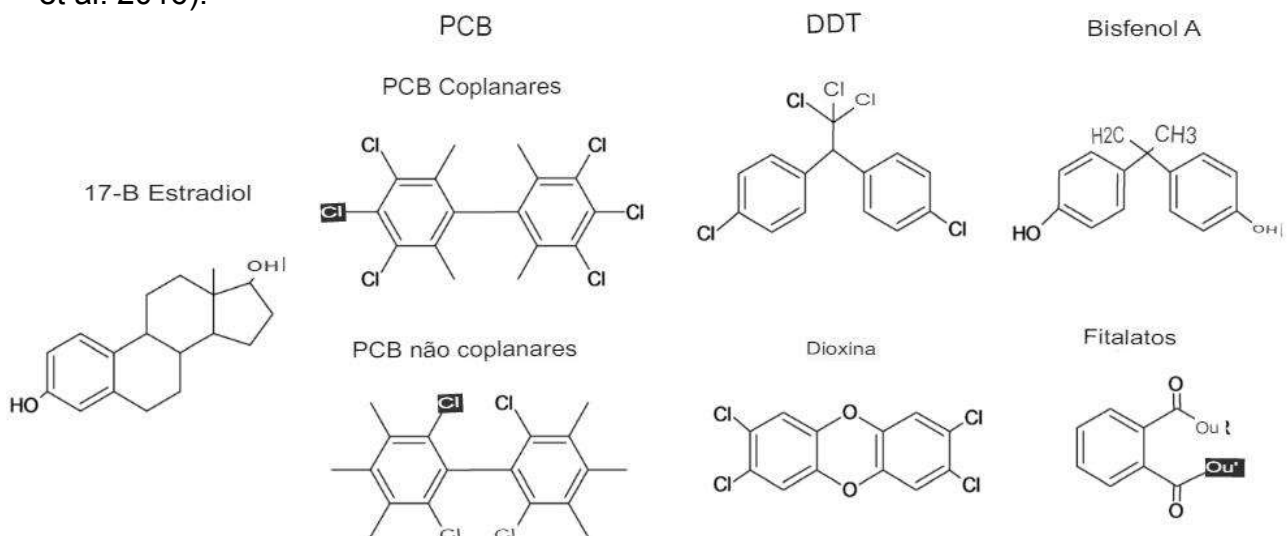


Figura 1: Desreguladores endócrinos compreendendo vários grupos de substâncias químicas como solventes industriais (PCB Coplanares, PCB não coplanares); pesticidas (Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), dioxina) e plastificantes (ftalatos, bisfenol A) com estruturas similares ao 17- β -estradiol (Yılmaz et al. 2020).

Os desreguladores endócrinos estão associados com o surgimento de efeitos deletérios em homens e mulheres, podendo afetar a saúde reprodutiva, contribuir na ocorrência de desordens metabólicas, alterar a homeostase da tireóide e aumentar o risco de cânceres sensíveis a hormônios (Kumar et al. 2020).

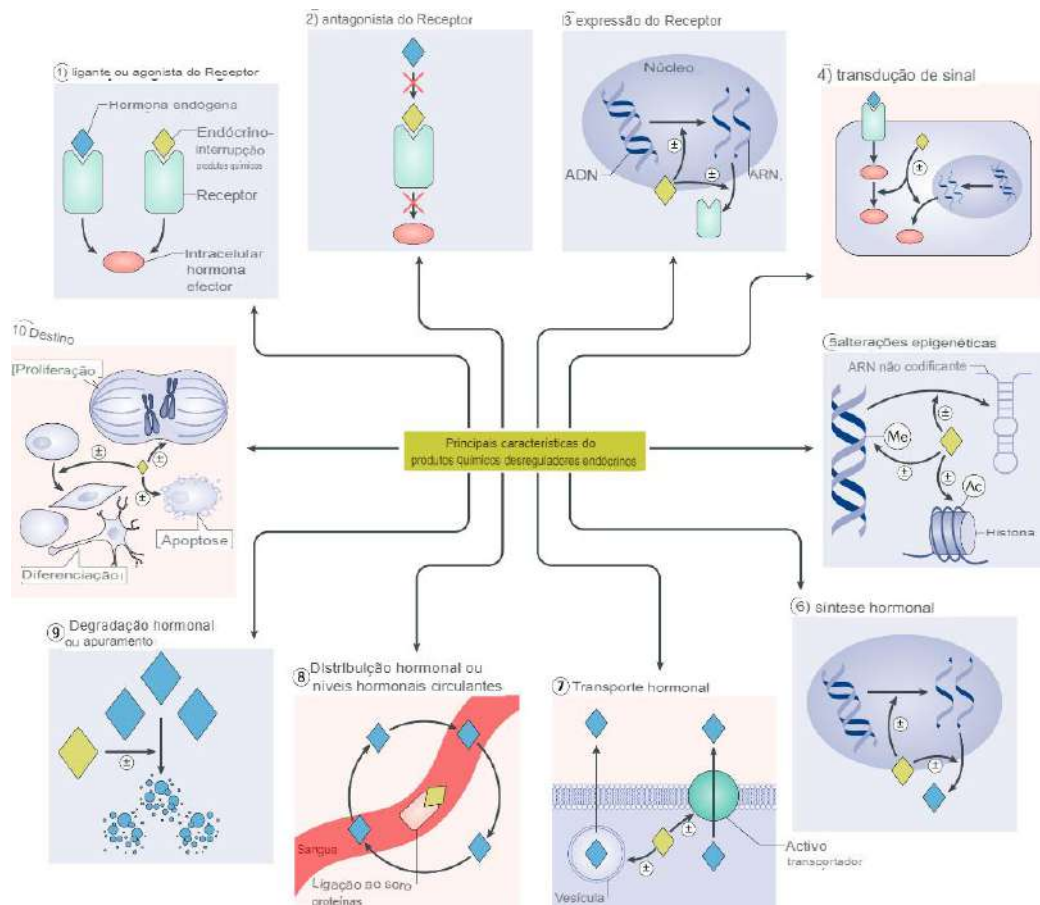


Figura 2: Imagem esquemática dos principais mecanismos de ação de produtos químicos desreguladores endócrinos (adaptado La Merrill et al. 2020).

Além disso, o aumento da exposição aos DEs está vinculada com o surgimento de doenças metabólicas, como obesidade e Diabetes Mellitus. Em muitos estudos experimentais a exposição aos DEs é diretamente proporcional com o ganho de peso, sendo mediado pelo receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ). Através desses receptores, alguns desreguladores endócrinos atuam na programação das células tronco mesenquimais, direcionando-as a diferenciação em linhagem de adipócitos. E a partir dessa característica, alguns contaminantes ambientais são

chamados de obesogênicos (Maloney and Waxman 1999). Ademais, já foi relatado a relação entre os desreguladores endócrinos e distúrbios no metabolismo glicêmico (Chamorro-García et al. 2013; Heindel et al. 2015; Lind et al. 2018).

O período de exposição aos químicos ambientais é um fator importante para os efeitos descritos. A fase do desenvolvimento do feto e/ou neonato é a mais vulnerável para ação de fatores externos como os desreguladores endócrinos, uma vez que estes conseguem interferir na síntese e ação de hormônios esteroidais sexuais e prejudicar tanto o desenvolvimento quanto a fertilidade, dentre outros efeitos (Yilmaz et al. 2020).

1.1.2 Plastificantes

Os desreguladores endócrinos incluem um grupo de substâncias chamados de plastificantes. Como exemplo, têm-se os compostos xenoestrógenos como Bisfenol A (BPA), Bisfenol F (BPF), Butil-benzil ftalato (DBP) e Di-etilhexil ftalato (DEHP) (Fromme et al. 2002). Funcionam como aditivos em materiais plásticos conferindo-lhe maleabilidade, flexibilidade e durabilidade (Xu et al. 2020). Por não se ligarem covalentemente à matriz do plástico, podem facilmente se desprender do material e contaminar o ambiente ou sistema com o qual esteja em contato (Munksgaard et al. 2004; Białecka-Florjańczyk et al. 2007; Tüzüm et al. 2012)

Esses químicos podem ser encontrados associados a plásticos, como as embalagens de comida e bebidas, roupas, móveis e produtos de cuidados diários (Maradonna et al. 2022; Qadeer et al. 2022). O PVC (policloreto de vinila) é um dos mais notórios exemplos, pois é empregado em larga escala na área industrial. São produzidas cerca de dez milhões de toneladas por ano, e 40% do peso do PVC contém plastificantes (Mersiowsky et al. 2001).

Devido a crescente onda de produção e consumo de plásticos, há uma maior e contínua exposição da população aos químicos que estão associados a eles. Além disso, muitos desses químicos são bioacumulados nos tecidos biológicos, uma vez que podem ser lipofílicos e serem depositados no tecido adiposo (Zoeller et al. 2016).

Os plastificantes e seus metabólitos já foram vistos apresentando efeitos negativos na saúde humana, como por exemplo no desenvolvimento do feto, em sistemas reprodutivos e cardiovascular (Le Moal et al. 2016; Baralić et al. 2020; Camacho et al. 2020).

1.1.3 Ftalato DEHP

O DEHP, di etil-hexil ftalato, possui em sua fórmula um par de ésteres com oito carbonos ligados a um anel ácido benzeno dicarboxílico, com peso molecular de 390,56 g.mol⁻¹ e fórmula química C₂₄H₃₈O₄, como mostra na FIGURA 3. É um plastificante e confere flexibilidade aos materiais plásticos, além de ser o polímero mais abundante encontrado (Rowdhwal et al. 2018). Cerca de 2 milhões de toneladas de ftalato são produzidas anualmente (Shelby et al. 2006). Além disso, é comumente encontrado em materiais associados ao PVC, como em brinquedos, cremes, embalagens de comida, até mesmo em bolsas de soro de hospitais (Earls et al. 2003; Konecki et al. 2011; Dobrzyńska et al. 2016).

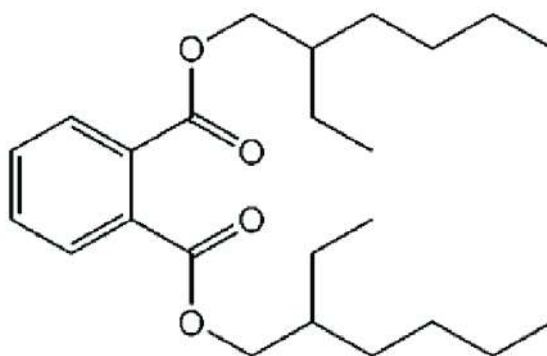


Figura 3: Imagem da estrutura química do DEHP (di-hetilexil ftalato) (Zhao et al. 2023). Update on Medical Plasticised PVC.

A exposição humana pode ocorrer por via dermal, inalação, oral, intravenosa e atualmente se estuda a transmissão pelo leite materno (Manori et al. 2006; Hung et al. 2021). Além disso, o DEHP, como já mencionado na classe dos ftalatos, não é

covalentemente ligado aos polímeros macromoleculares, o que significa que pode facilmente migrar dos produtos aderidos para o ambiente (Al Salloum et al. 2016; Jeon et al. 2016).

O DEHP é listado pela União Europeia (UE) como uma substância de alta atividade disruptora endócrina (Lu et al. 2020). A UE também determina que a mínima dosagem relatada que não se observa efeitos na reprodução em humanos (NOAEL) é de 4,8 mg/Kg/dia, e a dose diária tolerável (TDI) de 0,05 mg/kg/dia.

No trabalho de Wan et al. 2013, os autores analisaram as quantidades de químicos ambientais em 153 amostras de plasma, coletadas em Hong Kong, de homens e mulheres na faixa de 16 a 39 anos. O DEHP apareceu em mais de 95% das amostras, com uma média de 11.06 ± 4.28 ng/mL presentes no plasma sanguíneo. Além disso, no trabalho de Koch et al. 2003 foram feitas análises para verificar a presença de metabólitos do DEHP na primeira urina da manhã de 85 pessoas do norte da Alemanha (53 mulheres e 32 homens, na faixa de 7 a 64 anos de idade). Eles observaram uma média de 46,8 µg/L do metabólito 5OH-MEHP, 36,5 µg/L de 5-oxo-MEHP e 10,3 µg/L do MEHP. Assim, se torna evidente a presença do ftalato em contato com o organismo humano.

Segundo o Ministério da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na resolução da diretoria colegiada - RDC N° 326, de 3 de dezembro de 2019, o limite tolerável de migração específica para o DEHP, em embalagens, é de 1,5 mg/Kg. No entanto, estudos sobre a migração do DEHP foram feitos em 37 amostras de filme flexível de PVC e as análises do filme flexível tiveram como resultado uma migração específica de DEHP entre 79 e 2668 mg/Kg dos filmes, totalmente insatisfatória e preocupante (Bazilio et al. 2014; Lu et al. 2020).

Tanto para roedores quanto para humanos, após a ingestão, o DEHP é rapidamente metabolizado pelas lipases pancreáticas no lúmen intestinal para a forma monodi-etilhexil ftalato (MEHP). MEHP é então oxidado para os metabólitos secundários que incluem mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalato (MEOHP), mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalato (MEHHP) e mono-(2-etil-5-carboxipentil) ftalato (MECPP) como mostra na FIGURA 4 (Koch et al. 2005). Após esse processo, os compostos são metabolizados em metabólitos oxidativos que podem ser

glucorinizados, método de excreção de uma substância, que não são utilizadas como fonte energética, pela conversão desses compostos em glicuronídeos, através da ligação do ácido glicurônico. Esse processo, por sua vez, ocorre antes da excreção destes metabólitos pelas fezes e urina. (Albro et al. 1973; Albro et al. 1989; Manori et al. 2006).

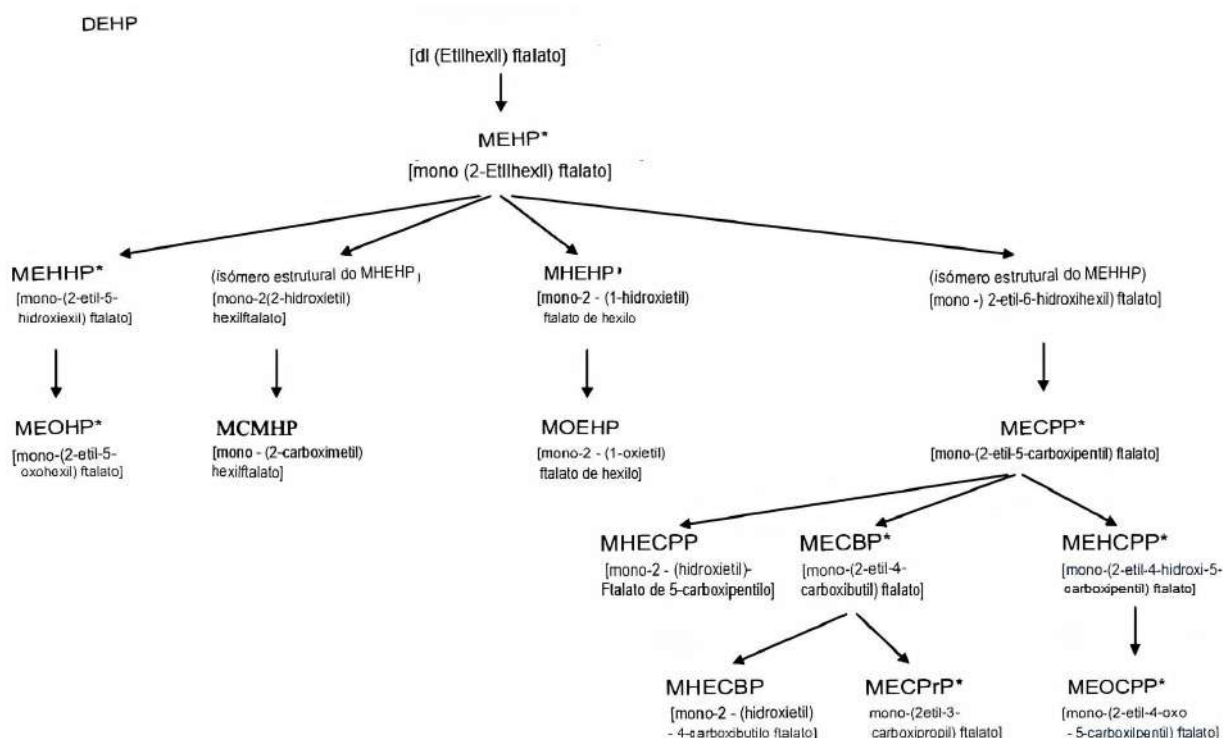


Figura 4: Esquema de metabolização do DEHP (di-hetilexil ftalato) em humanos (Caldwell 2012).

São feitas diversas associações do DEHP com doenças como obesidade e diabetes, uma vez que ele possui características obesogênicas como aumento da ingestão, peso corporal, aumento do TAB (tecido adiposo branco), aumento da leptina e diminuição da adiponectina sérica (Schmidt et al. 2012; Kim et al. 2013; Lv et al. 2016). Além disso, estudos recentes relatam a neurotoxicidade do DEHP com impactos como dano oxidativo celular, apoptose, desequilíbrio de canais iônicos, entre outros mecanismos (Luo et al. 2019; Liu et al. 2022). Luo et al. 2019, por exemplo, expuseram codornas fêmeas a 250 mg/Kg/dia, 500 mg/Kg/dia e 1000 mg/Kg/dia de DEHP pelo método de gavagem oral, no período de 45 dias, e observaram potencial

neurotoxicidade do ftalato no cérebro. Já no trabalho de Liu et al. 2022, a exposição ao DEHP foi realizada em ratas gestantes, com 300 mg/Kg/dia inseridos na comida, com e sem a presença de Zinco, do dia 0 ao 19 da gestação. Estes autores, por sua vez, observaram que o DEHP afetou a neurogênese no cérebro fetal e a homeostase do zinco da prole.

O sistema reprodutivo também é afetado pela ação do DEHP, uma vez que ele funciona como um inibidor da esteroidogênese. Em Agarwa et al. 1985, com a exposição subcutânea de 1 - 10 mg/kg de DEHP em camundongos ICR, machos adultos, foram observadas reduções de nascimentos, com o tratamento de DEHP em relação ao controle. Em Agarwa et al. 1989, a exposição também foi subcutânea de 1 - 100 mL/Kg de DEHP em camundongos, no entanto, ocorreu tanto em machos como em fêmeas. Nesses trabalhos, portanto, evidenciou-se a redução da fertilidade, apresentando efeitos como menor densidade e mobilidade do esperma, além de interferência nos níveis de testosterona e possível relação com desregulações no colesterol (Agarwa et al. 1985; Agarwal et al. 1989; Botelho et al. 2009; Martino-Andrade et al. 2010).

1.2 Hipótese DOHaD

A origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD, do inglês *Developmental Origins of Health and Disease*) é uma hipótese originada da proposta inicial chamada de *Origens Fetais das Doenças em Adultos* (do inglês *Fetal Origins of Adult Disease*) de 1990 (Hales et al. 1991). A hipótese postula que fatores ambientais estressores durante períodos críticos do desenvolvimento, da concepção à primeira infância, podem conduzir a consequências à saúde a longo prazo (Baker et al. 2007). Fatores como desnutrição, infecções, exposição a substâncias químicas, e mais recentemente poluente desreguladores endócrinos podem, por exemplo, alterar o meio intrauterino e conseqüentemente modular o desenvolvimento do neonato contribuindo com o surgimento de doenças na vida adulta como mostra na FIGURA 5 (Barker et al. 2007; Gluckman et al. 2008; Tedner et al. 2012).

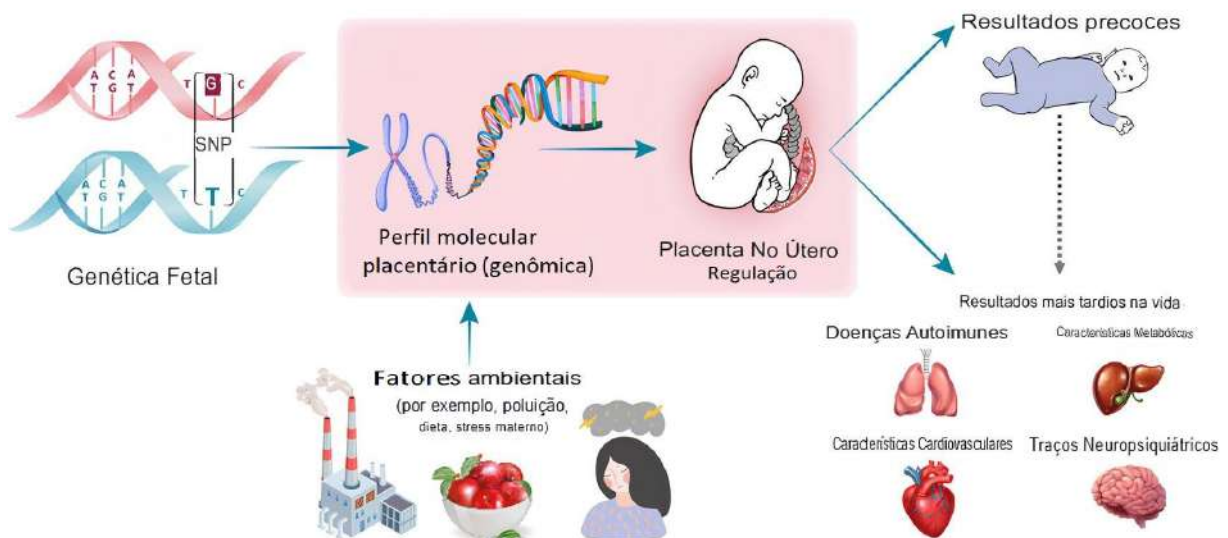


Figura 5. Representação esquemática da premissa DOHaD: exemplificação de fatores ambientais afetando o desenvolvimento placentário e contribuindo para o surgimento de desordens a curto e longo prazo (Bhattacharya et al. 2022).

Nesse sentido, o que a literatura descreve é que fatores estressores podem afetar o padrão epigenético (metilação de DNA e/ou modificações de histonas) do indivíduo em desenvolvimento. Essas mudanças, levariam a regulação na expressão

gênica em vias cruciais do metabolismo, predispondo o indivíduo ao surgimento de desordens metabólicas na vida adulta. (Barker et al. 2001; Bateson et al. 2004; Moskalev et al. 2014; Langley-Evans et al. 2010). Atualmente, além da importância do período intrauterino para a hipótese DOHaD, outras fases críticas são consideradas como susceptíveis a programação como lactação, primeira infância e adolescência (Langley-Evans et al. 2010; Bateson et al. 2004; Bronson et al. 2016).

O período lactacional faz parte de uma etapa importante para o desenvolvimento dos mamíferos, como é bem descrito na literatura. No crescimento do neonato, alterações na composição e/ou produção do leite materno podem ocasionar mudanças no SNC (Sistema Nervoso Central), alterações em órgãos periféricos, como nas células β -pancreáticas, e até mesmo influenciar a composição da microbiota intestinal. Isso ocorre pois o leite possui em sua composição lipídios, carboidratos, proteínas, enzimas, vitaminas, hormônios e outras biomoléculas essenciais para suprir necessidades nutricionais e funcionais no desenvolvimento do neonato (Picó et al. 2021). Além disso, muitos estudos demonstram como a presença de agentes estressores no período da lactação pode ser capaz de programar o metabolismo na primeira infância (Souza et al. 2022). Sugere-se então o período da lactação como janela de susceptibilidade, contribuindo para a hipótese DOHaD (Gomes et al. 2018).

1.2.1 DEHP e metabolismo materno

O período lactacional é de grande demanda energética para a lactante. Para a produção do leite é necessária uma mobilização dos tecidos maternos e aumento do consumo de alimentos. Requer tanto um suprimento nutricional quanto o desenvolvimento de mecanismos que garantam o uso preferencial dos nutrientes obtidos para a glândula mamária. É característico um aumento da secreção de prolactina e ocitocina, assim como da supressão do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal e quadros de hipoinsulinemia (Vernon 1989). Durante a lactação, o decaimento dos níveis de estrogênio e progesterona é essencial para a lactogênese, uma vez que esteróides sexuais inibem os efeitos lactogênicos da prolactina (Horseman 1999).

A prolactina, por sua vez, atua localmente na glândula mamária e estimula a síntese e secreção de componentes do leite, mas também diminui a lipogênese no fígado e no tecido adiposo, assim como aumenta a entrega de glicose e lactato, precursores lipogênicos, para a glândula mamária. Além disso, é a prolactina que estimula a regeneração, diferenciação e manutenção do epitélio do tecido secretório, durante a lactação (Knight et al. 1986; Hassiotou et al. 2013).

A sensibilidade à insulina é aumentada na glândula mamária e diminuída no músculo e no tecido adiposo, reduzindo a lipogênese na periferia. Os adipócitos, por sua vez, aparentam aumento da lipólise durante a lactação (Mcnamara et al. 1995). Isso ocorre em resposta à estimulação da norepinefrina em adipócitos da região femoral (Rebuffé-Scrive et al. 1985). As concentrações de insulina, cortisol e tiroxina séricos tendem a ser menores durante a lactação (Motil et al. 1994). As mudanças neuroendócrinas possuem o objetivo de facilitar a entrega dos nutrientes para a glândula mamária. A lactação é um período que altera o ambiente hormonal e sua sinalização materna a favor da lipólise.

Há diferenças anatômicas das glândulas mamárias entre os roedores e os humanos. Os humanos possuem um par de mamilos e glândulas mamárias, enquanto os ratos possuem 6 pares. Em ratas fêmeas as glândulas mamárias são tubuloalveolares com um sistema ramificado de ductos e alvéolos secretórios terminais organizados em lóbulos (Masso-Welch et al. 2000). Na mulher, a glândula mamária normal consiste em 2 grandes estruturas (ductos e lóbulos), dois tipos de células

epiteliais e dois tipos de estroma (interlobular e intralobular), com cerca de 15 a 20 ductos maiores que se conectam até o mamilo (Masso-Welch et al. 2000; Pillay et al. 2022). Em contraste, no rato, cada glândula tem um único ducto lactífero se conectando até o mamilo (Ballard et al. 2013).

Mudanças na produção do leite materno o divide em 3 tipos, o colostro, leite transicional e leite maduro. O colostro caracteriza o primeiro leite formado, rico em proteína, imunoglobulinas e sódio, mas baixo em lactose. Em humanos, ele é produzido no final da gestação, durante os 5 dias após o nascimento. Já o leite maduro ocorre após o período de 5 a 15 dias após o parto, caracterizado por uma mistura do leite anterior, rico em água, com pouca gordura e altos níveis de lactose, com o leite posterior que apresenta altos níveis de gordura, importante para o crescimento do bebê (Waard et al. 2017).

Em ratos, a lactação é dividida em períodos: precoce, médio e tardio (Bautista et al. 2019). O período inicial são os 6 dias após o nascimento, o médio são do 7 ao dia 14, após o nascimento, sendo considerado o período de máxima produção do leite. E, o período tardio, quando a produção declina, se caracteriza do dia 15 até o último dia (21) da lactação, como mostra na FIGURA 6 (Knight et al. 1986).

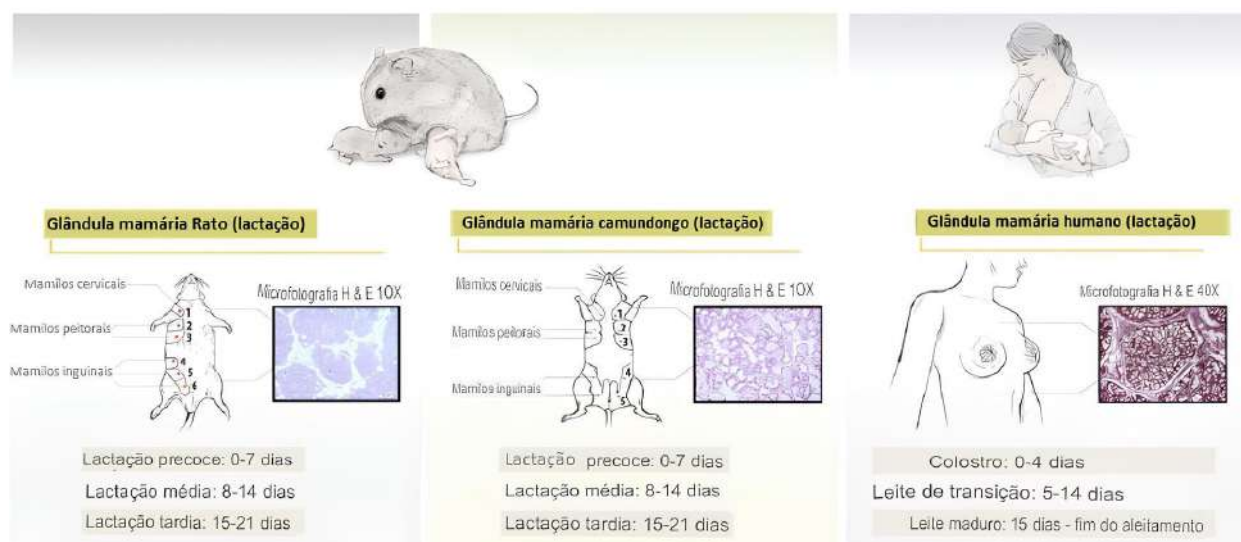


Figura 6. Diferenças da anatomia da glândula mamária de ratos, camundongos e humanos, respectivamente, assim como diferenças dos períodos da lactação. Abreviação: H & E, Hematoxilina e Eosina (Rodríguez-González et al. 2020).

O período da lactação e gestacional são fases de vulnerabilidade pela exposição a químicos ambientais como o DEHP (Bellinger et al. 2013). O di-etilhexil ftalato causa desordens metabólicas maternas (Aldyeva et al. 1975; G. Latini et al. 2003). Já foram evidenciados efeitos do DEHP e alguns metabólitos influenciando no desenvolvimento placentário de ratas, atuando na inibição da proliferação celular e prejudicando o desenvolvimento do feto (Schmidt et al. 2012; Zong et al. 2015; Venturelli et al. 2019; Hou et al. 2022; Sun et al. 2022).

Os ovários são alvos para a ação do DEHP, e há influência na diminuição da fertilidade em ratas fêmeas. Além disso, outro ftalato (MEHP) pode, em modelos *in vitro*, diminuir a biossíntese do estradiol pela supressão da atividade enzimática da aromatase, causando um desequilíbrio hormonal e prejudicando o sistema reprodutor feminino. Por outro lado, em modelos *in vivo*, a exposição a altas doses de DEHP, 500 mg/Kg/dia, pré e pós natal resultou em alterações no número de folículos (Sjöberg et al. 1986; Davis et al. 1994; Wolf et al. 1999; Grande et al. 2007; Wolterbeek et al. 2015).

A influência do contaminante no metabolismo materno ainda não é completamente compreendida, ademais a presença do DEHP no período periconcepcional, pós concepcional e no líquido amniótico já foi evidenciada, com doses que variam de 1,2 mg/Kg/dia até 405 mg/Kg/dia (Adibi et al. 2003; Latini et al. 2003; Silva et al. 2004; Huang et al. 2007), mas seus potenciais efeitos sobre o desenvolvimento fetal, assim como suas consequências em longo prazo, ainda estão sendo elucidados. Quando o foco está sobre o período da lactação, os estudos sobre ftalatos, metabolismo materno e suas consequências para a progênie são ainda desconhecidos na literatura.

2. Objetivo

Investigar os efeitos da exposição ao DEHP (di-etilhexil ftalato) em ratas lactantes *Wistar* fêmeas, sobre o metabolismo e a homeostase glicêmica durante o período da lactação.

2.1 Objetivos específicos

Nas ratas fêmeas expostas ao DEHP durante o período de lactação, propomos testar e avaliar os efeitos do ftalato sobre:

- a) As medidas murinométricas de evolução da massa corporal, ingestão alimentar diária e ganho de massa corporal;
- b) A glicemia em jejum e níveis de insulina sérica;
- c) Os índices HOMA- β (capacidade secretória de insulina pelas células β pancreáticas) e HOMA-IR (resistência à insulina);
- d) O peso relativo do TAB visceral e hepático;
- e) O perfil lipídico sérico: lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c), triglicérides (TGL) e colesterol total sérico (CT);
- f) A expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina: proteína quinase B (AKT) e proteína quinase B fosforilada (AKT-p) no tecido hepático e adiposo branco visceral.
- g) As medidas murinométricas de evolução e ganho de massa corporal, peso relativo do TAB visceral e hepático da prole exposta de forma indireta, pelo leite materno ao DEHP, ao desmame.

3. Metodologia

3.1 Modelo experimental

O modelo experimental utilizado neste trabalho consistiu no uso de ratos Wistar fêmeas, com aprovação pelo comitê de ética em Pesquisa Animal da instituição sob o número 099/19. Os animais do projeto foram fornecidos pelo Biotério Central (IBCCF-UFRJ) e mantidos em condições adequadas de temperatura ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), com livre acesso a comida e água, e ciclo de luz (claro-escuro) de 12 horas.

Ao total 12 ratas Wistar foram colocadas para acasalar, na proporção de três fêmeas para um macho (3:1). Depois do acasalamento, as ratas grávidas (9 ao total) foram separadas dos machos e divididas aleatoriamente em três grupos, (n = 3/cada.) Além disso, foram determinados 6 filhotes machos por rata, em cada grupo, durante todo o período da lactação, como é demonstrado na FIGURA 7.

A partir da divisão, ocorreu a exposição ao DEHP (CAS 117-81-7, D201154; Sigma-Aldrich $\geq 99,5\%$) diluído em óleo sésamo comercial (CAS 8008-74-0, S3547; Sigma-Aldrich), pelo método de gavagem oral materna. A exposição ao ftalato foi feita nas mães, no período da lactação, do dia 1 ao dia 21, a partir do nascimento dos filhotes até o desmame (pós-natal, PN1 ao PN21). Dessa forma, os três grupos foram divididos em:

- Grupo controle: veículo com óleo de sésamo;
- Grupo baixa dosagem: 100 mg/kg/dia de DEHP;
- Grupo alta dosagem: 500 mg/kg/dia de DEHP.

As dosagens utilizadas de 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia já foram relatadas na literatura como diretamente relacionada com a ocorrência de efeitos no sistema reprodutivo de ratos machos, principalmente com o órgão reprodutor (Martinez-Arguelles et al. 2009; Daniel et al. 2011; Rowdhwal et al. 2018), sendo essa faixa de doses as mais utilizadas pela literatura.

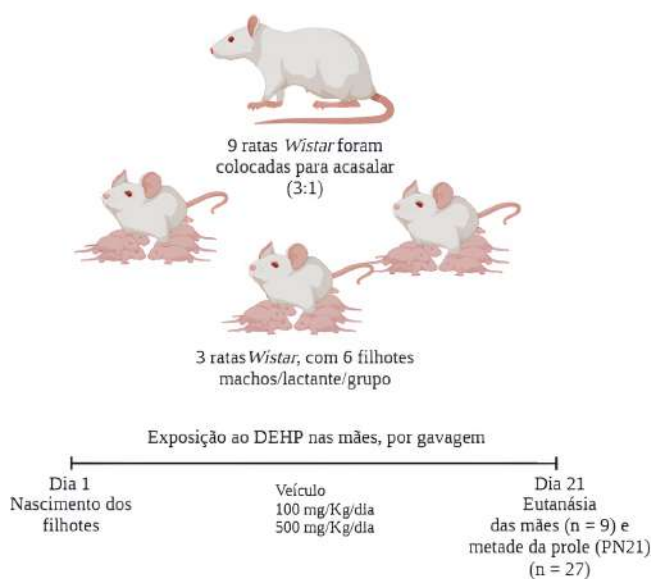


Figura 7: Modelo esquemático da metodologia experimental realizada. Feita no site BioRender (a autora).

No dia final da exposição, ao desmame das proles, as ratas lactantes foram mantidas em jejum por 6 horas. Após o jejum e a análise da glicemia, a eutanásia ocorreu através da gilhotina, após uso de anestesia com 1,5% de Isoflurano (Sigma-Aldrich®, código 792632).

Cada animal foi devidamente separado dos demais no momento da eutanásia no intuito de evitar estresse. No final da exposição, no dia 21, metade das proles dos filhotes (n = 9 por grupo) também foram eutanasiadas (PN21) e a outra metade foi acompanhada até 90 dias (PN90), para análise a longo prazo dos efeitos indiretos ao DEHP. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugado (2500 rpm/25 min/ 4°C). O soro foi separado e armazenado em -20°C.

Os tecidos hepático (lobo lateral, lobo esquerdo e lobo mediano) e adiposo branco visceral (retroperitoneal, perigonadal e mesentérica) foram coletados. Os tecidos hepático e adiposo foram seccionados, pesados e colocados em microtubos. O armazenamento desses tecidos foi em -80°C, para as futuras análises bioquímicas e hormonais.

3.2 Avaliação murinométricas e nutricionais

Durante a exposição, as ratas lactantes foram pesadas uma vez por semana e a ingestão alimentar realizada a cada 3 dias. A partir desses dados, foram obtidos a evolução da massa corporal e o ganho de massa corporal ao longo do tratamento, além da avaliação de parâmetros como a eficiência alimentar, que consiste na razão entre a ingestão alimentar e o ganho de massa corporal (DA SILVA NERY *et al.*, 2011).

3.3 Pesagem relativa do tecido hepático e do tecido adiposo branco

Ao final da eutanásia, os tecidos hepático e adiposo branco visceral foram retirados e pesados em balança analítica. Após a pesagem do tecido hepático, um pequeno pedaço dos lobos: lateral, esquerdo e mediano foi retirado e armazenados juntos. Assim como para o TAB visceral, partes da região retroperitoneal, perigonadal e mesentérica foram coletadas e armazenadas juntas.

3.4 Avaliação da homeostase glicêmica

A glicemia de jejum materna foi medida após 6 horas em jejum. Foi feito um pequeno corte na ponta da cauda e o sangue foi coletado em fitas-testes com glicose oxidase. Os valores obtidos da glicemia foram marcados pelo glicosímetro (ACCU CHECK-Active, Roche®).

Para medição da insulina, foi utilizada a técnica ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) utilizando o ensaio Sandwich ELISA (Rat/Mouse Insulin ELISA- Sigma- Aldrich, código EZRMI-13k, Millipore® Corporation Billerica, MA, U.S.A). O método compreende uma reação enzimática medida espectrofotometricamente pela absorção entre os comprimentos de onda de 450 nm e 590 nm. Nesse método, o aumento da absorção é diretamente proporcional à quantidade de insulina capturada na amostra.

Com os valores de insulina e glicose obtidos, os índices HOMA foram calculados. O HOMA- β consiste na capacidade secretória de insulina das células β pancreáticas, e o HOMA-IR consiste na resistência à insulina.

Assim, segundo a descrição de MATHEWS *et al.* (1985), os cálculos para obtenção dos índices de HOMA foram:

HOMA-IR = (insulinemia em jejum (mU/L) x glicemia de jejum (mmol/L)/ 22,5).

HOMA- β = (20 x insulinemia de jejum [mU/L] / glicemia de jejum [mmol/L] - 3,5).

3.5 Avaliação do perfil lipídico

Na avaliação do perfil lipídico, os níveis séricos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TGL) e o colesterol LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade) foram avaliados por kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). Os testes de TGL e CT consistem em um processo enzimático colorimétrico, com cromógeno cereja responsável pela cor cereja, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de colesterol e triglicerídeos na amostra. Já no teste de LDL, o componente DSBmT = N,N - Bis(4 - Sulfobutil) - m - Toluidina Disódio é o responsável pela cor.

A equação de Friedewald (1972) foi utilizada para o cálculo da concentração de VLDL-c (Lipoproteína de muita baixa densidade), a partir da fórmula:

Colesterol VLDL = Triglicérides / 5.

3.6 Quantificação proteica por *Western Blotting*

Na técnica de *Western Blotting*, 50 mg do tecido adiposo e hepático foram processados e homogeneizados no equipamento Turrax, com o acréscimo de 1 mL do tampão RIPA (50 mM TRIS pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% TRITON x 100, 0,1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Ortovanadato de Na, 30 mM pirofosfato de Na), e do coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), no momento do processamento. Após o processamento com o Turrax, o tecido adiposo ainda passou por sonicação ultrassônica para quebra das gotas lipídicas e maior acesso às proteínas do tecido. Depois da homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 2534 xg /25 min/ 4°C. O sobrenadante do tecido hepático e o infranadante do tecido adiposo foram retirados e armazenados a -20°C.

Após processamento, a dosagem protéica das amostras foi realizada pelo Kit de Ensaio Proteico BCA Pierce, utilizando a leitura do espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm. Foram calculados os volumes de pipetagem para 10 µg de proteína/por homogenato do tecido adiposo e para 30 µg de proteína/homogenato do tecido hepático.

As amostras foram coradas com tampão de amostra e fervidas a 90°C por 5 minutos para desnaturação das proteínas, sendo as amostras pipetadas em gel de poliacrilamida 12%. Na primeira etapa foi realizada a eletroforese em gel das amostras separando as proteínas por tamanho (150V, 50 minutos). Logo em seguida, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose no sistema Semi-dry, da Bio-Rad (15V, 1h30m). Após a transferência, o bloqueio das proteínas foi realizado em uma solução de TTBS (solução salina tamponada com TRIS e 0,1% de TWEEN, pH 7,6) e leite Ninho Mólico Nestlé (5%) e posteriormente, a marcação proteica ocorreu com anticorpos primários e secundários, específicos para cada proteína e hospedeiro. Antes do bloqueio e de cada anticorpo, foram realizadas lavagens com TTBS 3x, por 5 minutos cada, na membrana.

A revelação das proteínas ocorreu por quimioluminescência, através do Sistema Automático de Imagem Molecular *ImageQuant*TM 500. As membranas foram incubadas overnight, a 4°C, com os anticorpos primários: p-AKT 1/2/3 1:500, sc-514032, *Santa Cruz Biotechnology*; AKT1 (B-1) 1:500, sc-5298, *Santa Cruz Biotechnology*; α/β -actina 1:1000, 2148S, *Cell Signalling*. Logo em seguida, foi feita marcação com os respectivos anticorpos secundários específicos para cada anticorpo primário, por 2 horas, a 4°C: anticorpo secundário Goat anti-Rabbit IgG HRP (H+L) 1:5000, #31463, *Invitrogen* e Goat anti-Mouse 1:5000 IgG HRP (H + LI-COR 1), 926-80010, *LI-COR Biosciences*.

Para análise dos resultados, os dados foram tratados e quantificados pelo programa *ImageJ* 1.8.0, feito em Java para processamento de imagens. Os valores foram inseridos em tabelas do Excel. Os resultados obtidos de p-AKT foram corrigidos pelos valores da AKT, assim como os valores de AKT foram corrigidos pelos valores respectivos da α/β -actina.

3.7 Avaliação murinométrica da prole ao desmame

Durante o período da lactação, as proles (n=54 total) foram monitoradas em evolução de massa corporal a partir da pesagem dos animais uma vez por semana. Ao desmame, metade da prole (n=27 total) foram eutanasiadas e os tecidos hepáticos e o TAB visceral também foram coletados, seccionados, pesados e armazenados em -80 °C.

3.8 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados, foi utilizado *One-way ANOVA* com dados não paramétricos, apresentando a média e desvio padrão, seguida do teste Bonferroni. Para diferenças significativas, $p < 0,05$. O GraphPad Prism® versão 8.0.1 (GraphPad Software, inc.) e o Excel foram empregados para computação e análise estatística dos dados, assim como para montagem dos gráficos.

4. Resultados

4.1 Perfil murinométrico materno

Os dados abaixo mostram os resultados obtidos após a exposição de 21 dias de DEHP, sobre a evolução da massa corporal e o ganho de massa corporal maternos, e como observado não se obteve nenhuma diferença estatística nos dados, embora se observe uma tendência ao aumento do ganho de massa corporal nos grupos de 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia, em comparação com o grupo controle, como mostra a FIGURA 8.

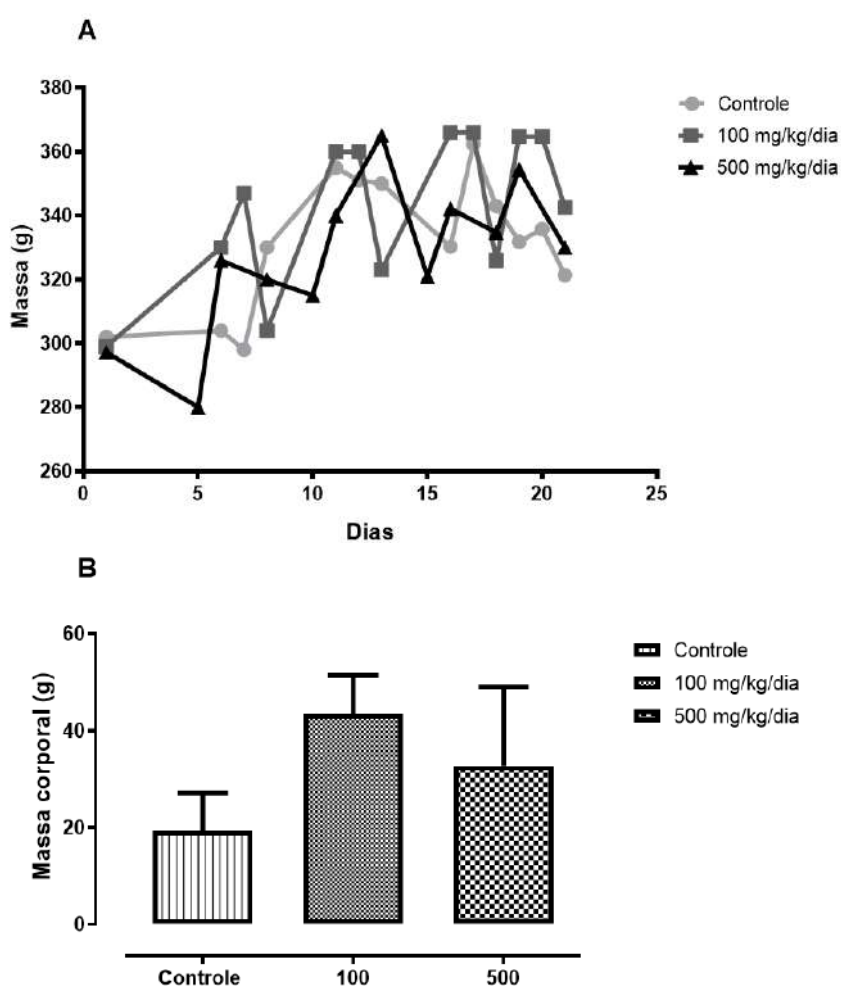


Figura 8. **A** apresenta a evolução da massa corporal dos grupos controle, 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia (valores de $P=0,2$ e $F=1,5$), e em **B** o ganho de massa corporal das mães lactantes expostas ao DEHP durante a lactação (valores de $P=0,3$ e $F=1,1$). ($n = 3$ por grupo). Teste estatístico one-way ANOVA, seguidos do teste Bonferroni, considerando $*p<0,05$, apresentando barras de erro.

Na FIGURA 9, são apresentados os resultados de ingestão alimentar e do coeficiente alimentar, onde não foi identificada diferença entre os grupos.

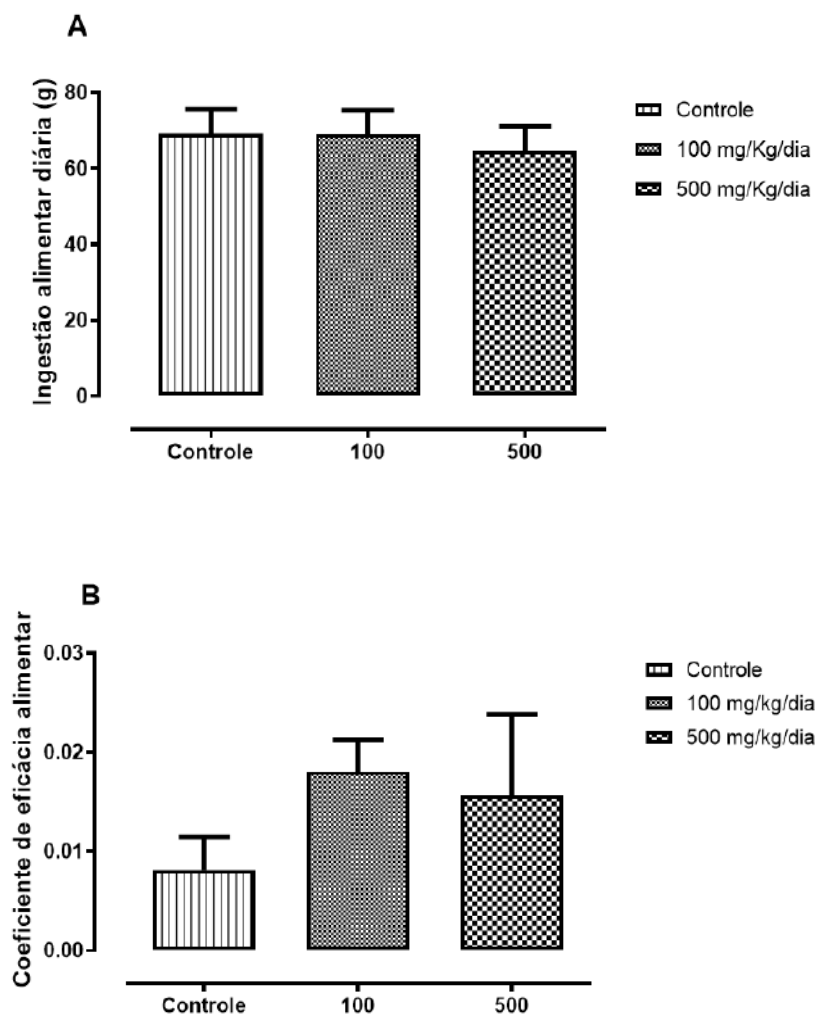


Figura 9. Em **A**, dados da ingestão alimentar dos grupos controle, 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia (valores de $P=0,8$ e $F=0,1$) e em **B**, os valores do coeficiente de eficácia alimentar das mães (valores de $F=0,9$ e $P=0,4$) lactantes expostas ao DEHP durante a lactação. ($n = 3$ por grupo). Teste estatístico one-way ANOVA, seguidos do teste Bonferroni, considerando $*p<0,05$, apresentando barras de erro.

Em relação aos dados do peso relativo do tecido adiposo branco e hepático materno, não houve alterações significativas entre os grupos, demonstrado na FIGURA 10.

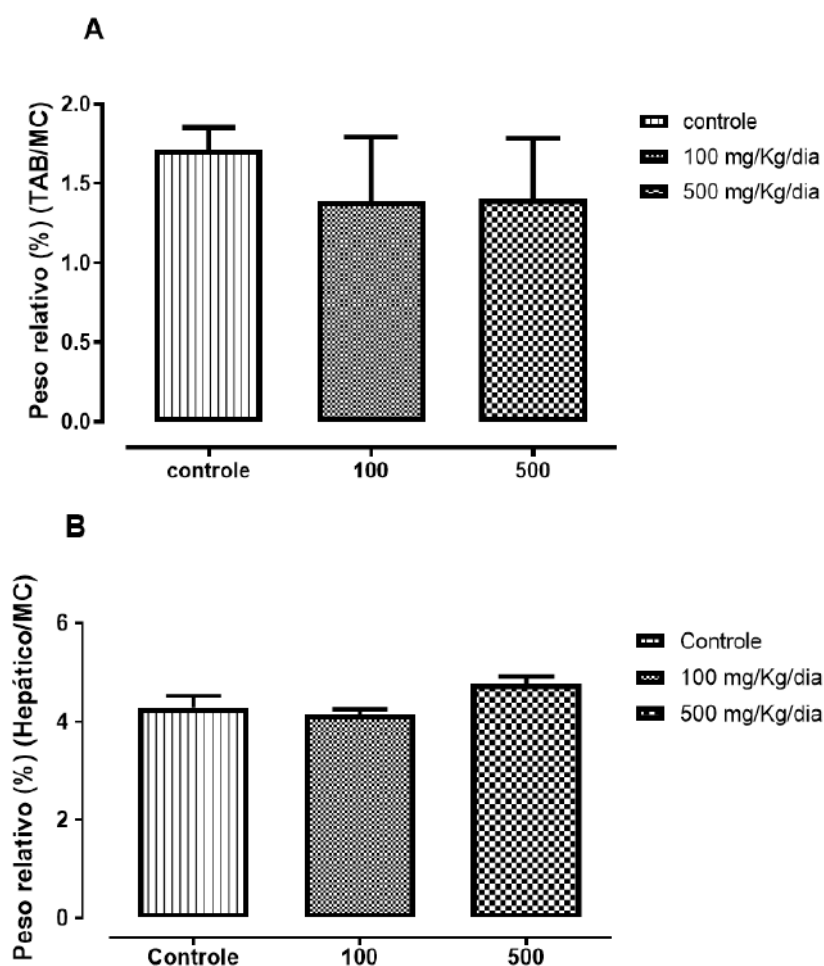


Figura 10. Em **A**, o peso relativo do tecido adiposo branco (TAB) (valores de $P=0,7$ e $F=0,3$), e em **B** o peso relativo do tecido hepático (valores de $P=0,09$ e $F=3,5$) das mães lactantes expostas ao DEHP durante a lactação. ($n = 3$ por grupo). Teste estatístico one-way ANOVA, seguidos do teste Bonferroni, considerando $*p<0,05$, apresentando barras de erro.

4.2 Perfil glicêmico materno

Em relação aos efeitos da exposição ao DEHP sobre a homeostase glicêmica, como mostra a FIGURA 11, os resultados abaixo mostram uma interferência sobre a glicemia de jejum, com aumento de +31,7% no grupo exposto a 100 mg/Kg/dia e +38,1% no grupo 500 mg/Kg/dia, em relação ao controle. Os níveis de insulina não diferiram estatisticamente entre os grupos. Com relação aos índices glicêmicos, não observamos diferença entre os grupos apesar da tendência ao aumento no HOMA-IR e diminuição no HOMA- β entre os grupos tratados, comparados ao grupo controle.

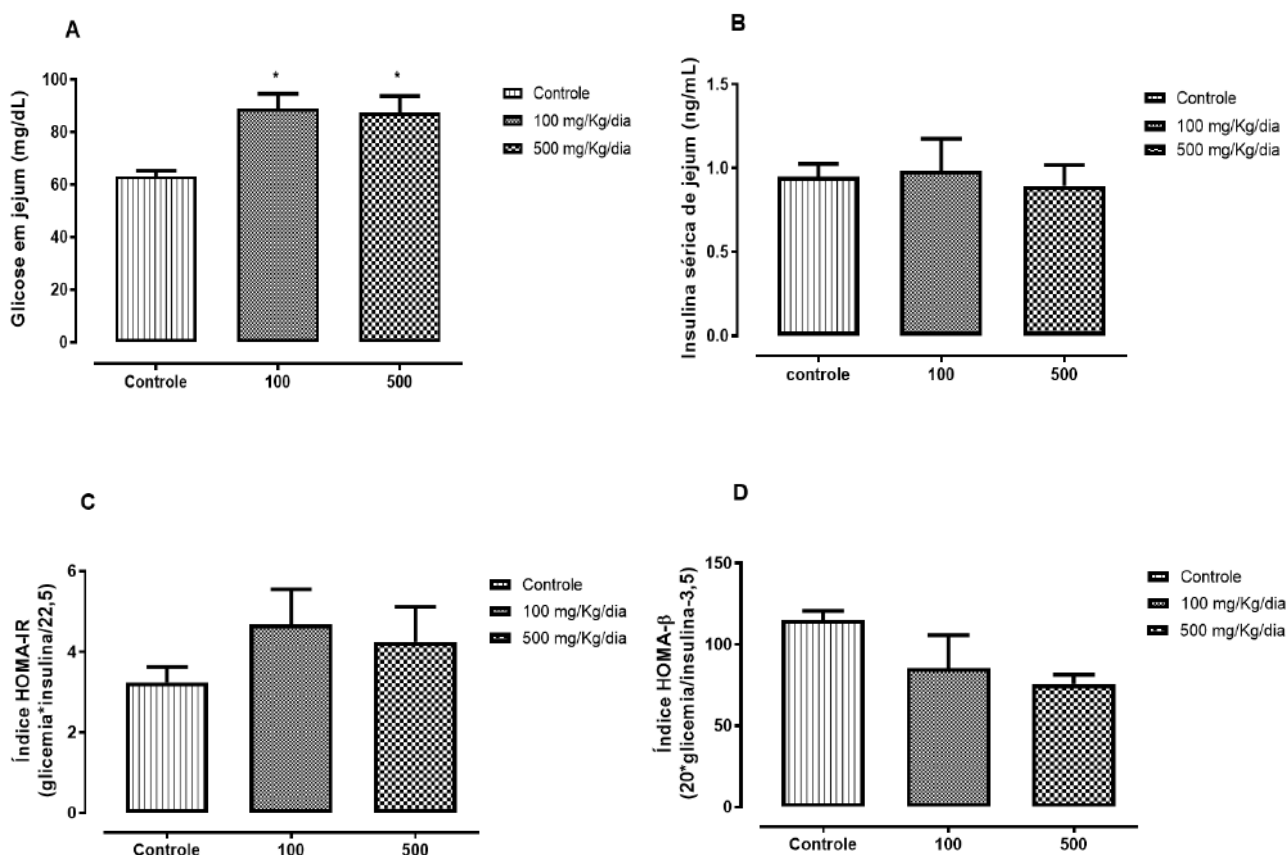


Figura 11. Em **A**, dados relativos à glicemia de jejum, dos grupos controle, 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia (valores de $P=8,2$ e $F=0,01$). Em **B**, a insulina sérica de jejum (valores de $P=0,9$ e $F=0,1$). Em **C** e **D**, os dados do índice HOMA-IR ($P=0,9$ e $F=0,4$) e HOMA- β ($P=2,6$ e $F=0,1$), respectivamente das mães lactantes expostas ao DEHP durante a lactação. ($n = 3$ por grupo). Teste estatístico one-way ANOVA, seguidos do teste Bonferroni, considerando $*p<0,05$, apresentando barras de erro.

4.3 Perfil lipídico materno

Em relação às análises do perfil lipídico materno, não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao nível de triglicérides, LDL e VLDL- C, no entanto houve diferença de 156,8% no grupo 500 mg/Kg/dia nos níveis séricos de colesterol em relação aos outros grupos , demonstrado na FIGURA 12.

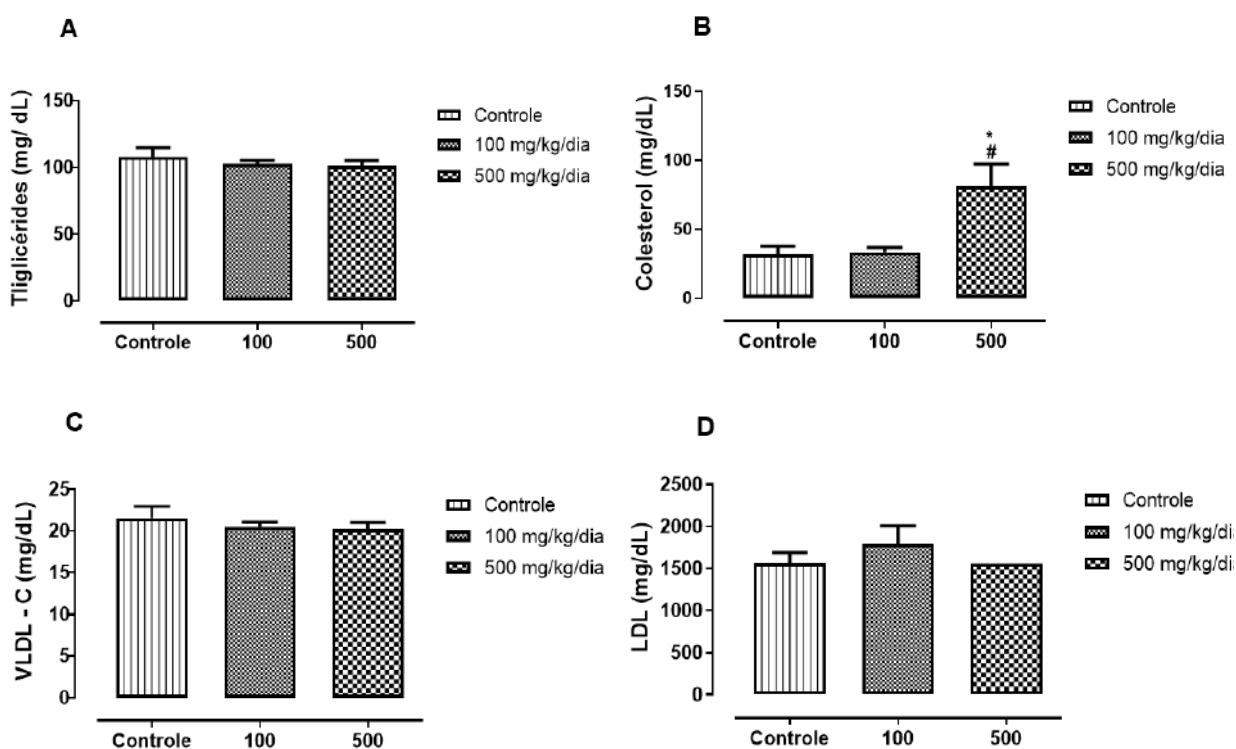


Figura 12. Em **A**, os triglicérides medidos dos grupos controle, 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia (valores de $P=0,6$ e $F=0,4$), em **B** o colesterol com $*p<0,05$ comparando o grupo 500 mg/Kg/dia com o controle e $\#p<0,05$ com o grupo 100 mg/Kg/dia ($P=0,01$ e $F=6,4$), em **C** os níveis de VLDL-C ($P=0,6$ e $F=0,4$) e em **D** os níveis de LDL ($P=0,6$ e $F=0,5$), das mães lactantes expostas ao DEHP durante a lactação. ($n = 3$ por grupo). Teste estatístico one-way ANOVA, seguidos do teste Bonferroni, considerando $*p<0,05$, apresentando barras de erro.

4.4 Quantificação proteica AKT e AKT-p materna

Através da técnica do *Western Blotting*, na FIGURA 13 demonstramos os resultados para a expressão proteica de AKT e AKT-p no tecido hepático, sendo possível observar que não houve diferença significativa na expressão dessas proteínas no tecido analisado.

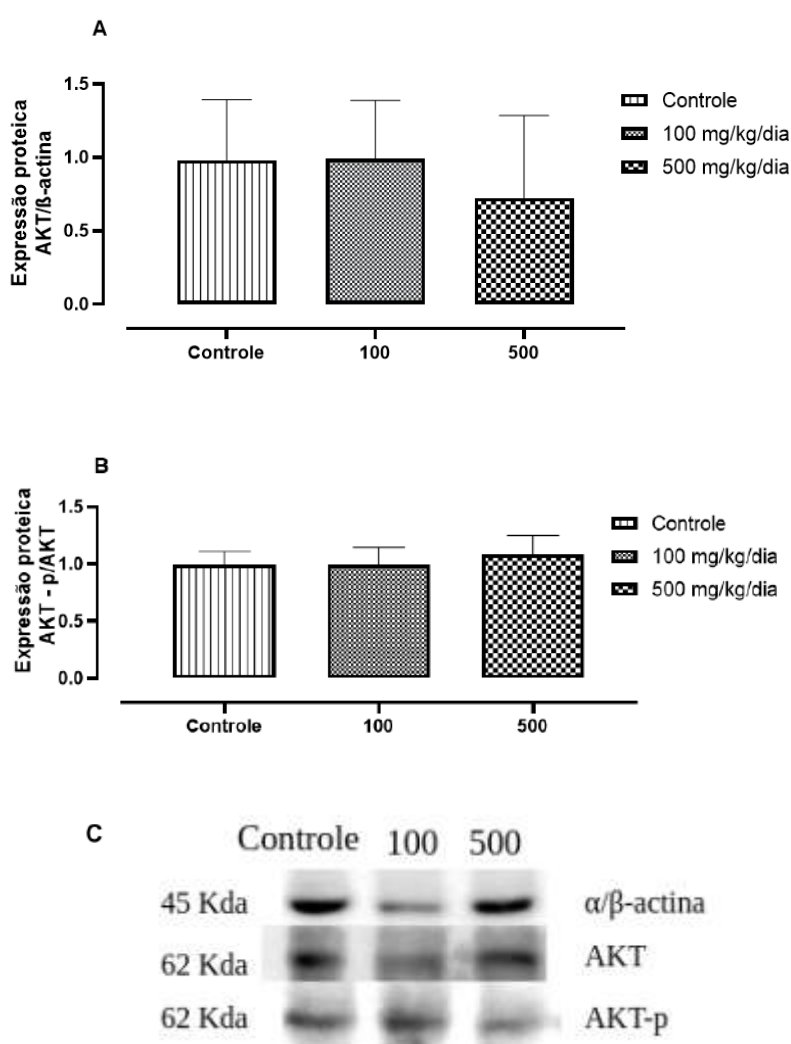


Figura 13. Dados quantitativos das proteínas analisadas pela técnica *Western Blotting*. Em **A**, mostra a expressão de AKT/β-actina dos grupos controle, 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia (valores de $P=0,7$ e $F=0,3$), em **B** a expressão de AKT-p/AKT ($P=0,6$ e $F=0,3$) e em **C** as imagens das bandas das proteínas analisadas relativas às mães lactantes expostas ao DEHP durante a lactação. ($n=3$ por grupo). Teste estatístico one-way ANOVA, seguidos do teste Bonferroni, considerando $*p<0,05$, apresentando barras de erro.

No tecido adiposo branco também não houve diferenças significativas na expressão de AKT e AKT-p nos grupos tratados com DEHP, em relação ao controle, mostrados na FIGURA 14.

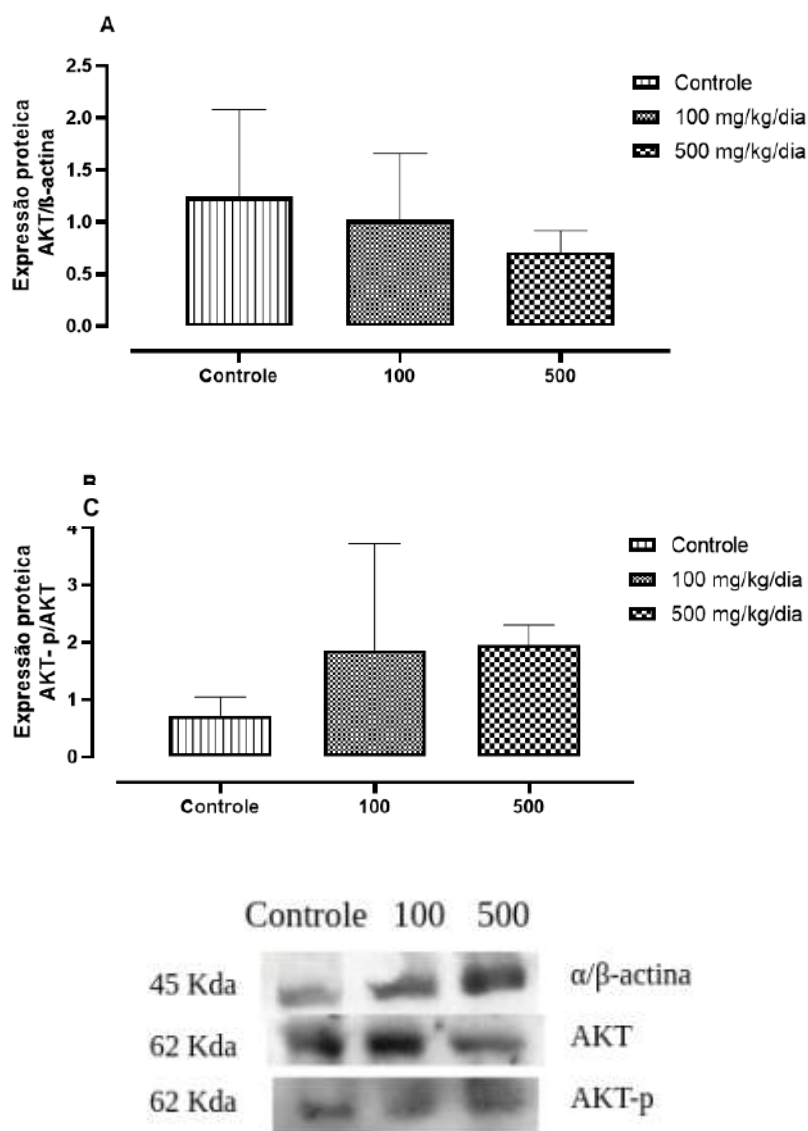


Figura 14. Dados quantitativos das proteínas analisadas pela técnica *Western Blotting*. Em **A**, mostra a expressão de AKT/β-actina dos grupos controle, 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia (valores $P=0,7$ e $F=0,3$), em **B** a expressão de AKT-p/AKT ($P=0,9$ e $F=0,4$) e em **C** as imagens das bandas das proteínas analisadas relativas às mães lactantes expostas ao DEHP durante a lactação. ($n = 2-3/\text{grupo}$). Teste estatístico one-way ANOVA, seguidos do teste Bonferroni, considerando $*p < 0,05$, apresentando barras de erro.

4.5 Perfil murinométrico filhotes PN21

Para compreender, se as alterações metabólicas observados nas mães lactentes de alguma forma impactaram no desenvolvimento da prole, alguns parâmetros dos filhotes foram analisados. Em relação aos filhotes, ao desmame (PN21), após a exposição materna de 21 dias ao DEHP, foi possível notar uma redução em -15,4% no ganho de massa corporal dos filhotes do grupo 500 mg/Kg/dia em relação ao controle. Além disso, o peso relativo do TAB da prole ao desmame, também se mostrou reduzido em -37,3% no grupo 500 mg/Kg/dia em relação ao controle, enquanto o peso relativo do tecido hepático não mostrou diferença, como revela a FIGURA 15.

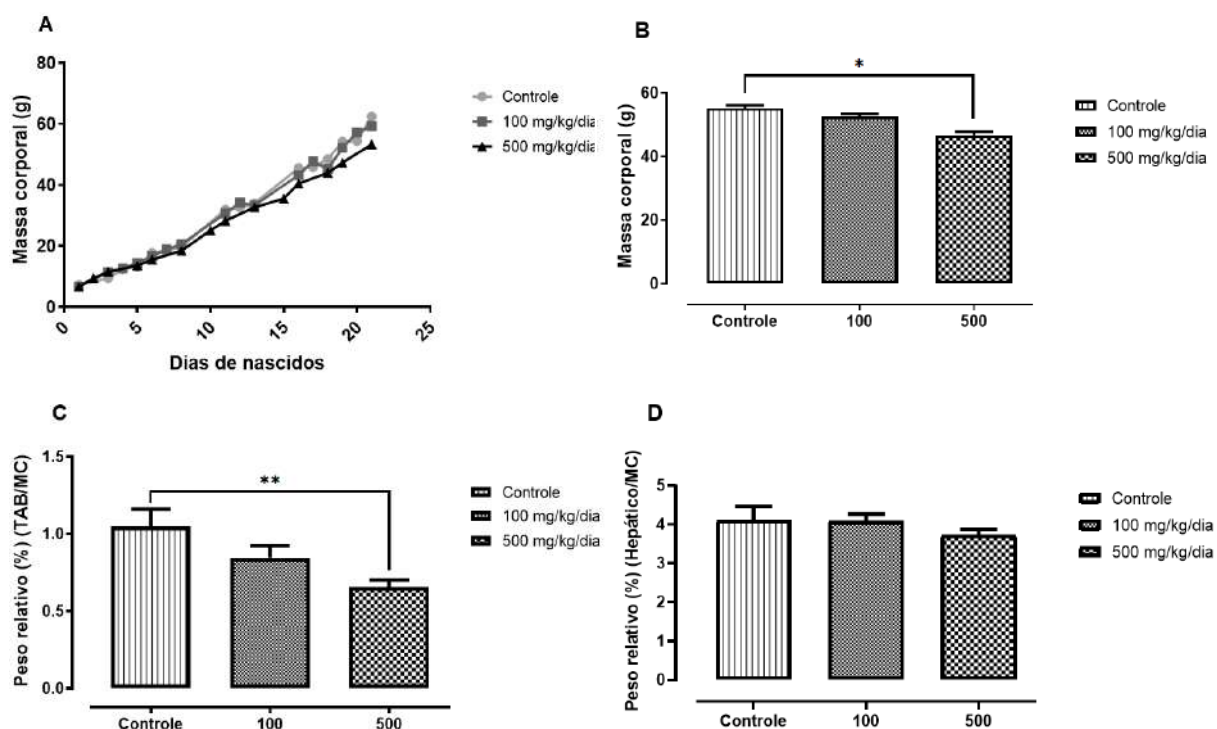


Figura 15. Dados dos animais PN21. Em **A**, a análise da evolução da massa corporal (valores $P=0,7$ e $F=0,3$), em **B** o ganho de massa corporal ($P<0,0001$ e $F=21,1$). Análises feitas nos filhotes dos grupo controle, 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia, durante a lactação. Em **C**, o peso relativo do tecido adiposo branco ($P=0,01$ e $F=0,5$), em **D** o peso relativo do tecido hepático ($P=0,4$ e $F=0,7$). ($n = 18$ por grupo em **A** e **B**) e ($n = 9$ por grupo em **C** e **D**). Teste estatístico one-way ANOVA, seguidos do teste Bonferroni, considerando $p<0,05$, apresentando barras de erro.

5. Discussão

Atualmente, o sobrepeso afeta cerca de 30% a 70% dos adultos na região da Europa e superior a 60% das crianças antes de entrarem na puberdade (Schmidt et al. 2012). A exposição aos desreguladores endócrinos ocorre durante todas as fases da vida. Na Europa, por exemplo, o DEHP compreende 18% de todos os plastificantes que são utilizados nos plásticos (Latini et al. 2010). A alta prevalência, portanto, pode contribuir para doenças como obesidade, hipertensão e diabetes de mellitus (Grün et al. 2009).

Além da obesidade, o diabetes mellitus entra como mais uma comorbidade com preocupações em todo o mundo. Em 2019, a prevalência do diabetes entre os adultos era de aproximadamente de 9,3%, indicando que cerca de 463 milhões de adultos possuíam diabetes e esse número pode ainda aumentar para 700 milhões em 2045 (Federação Internacional de Diabetes, 2019). Além disso, os desreguladores ambientais mostram direta relação com o desenvolvimento da diabetes. Sua ação evidencia modulações metabólicas e efeitos como resistência à insulina (Radke et al. 2019). Nesse sentido, o DEHP, pode causar efeitos adversos na homeostase glicêmica e na sensibilidade à insulina.

Dessa forma, ao analisar os resultados apresentados, muito pode ser discutido sobre as possíveis interferências do DEHP em períodos críticos do desenvolvimento, como a lactação, em especial sobre o metabolismo materno.

A escolha da dosagem nos modelos experimentais em animais é de extrema importância, visto que o funcionamento do organismo, área de superfície do corpo e farmacocinética, por exemplo, variam entre as espécies (Chaturvedi et al. 2001). A escala alométrica é uma abordagem empírica, a qual a escolha da dosagem da droga é baseada na normalização da dosagem pela área de superfície corporal do animal. Essa abordagem considera as características anatômicas, fisiológicas e processos bioquímicos entre as espécies, além das diferenças da farmacocinética em relação à fisiologia. Por isso, a escala é utilizada para a conversão entre as espécies (Rhombert et al. 2006). A dose máxima que não é evidenciada efeitos adversos (NOAEL) é utilizada e convertida para a dose estimada equivalente em

humanos (da sigla em inglês HED) associada com o fator de correção da área de superfície corporal (USFDA. 2005). Segundo a fórmula, o HED (mg / Kg) = Dose do animal (mg / Kg) * Km animal/ Km humano (Reagan-Shaw et al. 2008). Assim, ao empregar os valores das doses do nosso trabalho, e os respectivos valores de Km da literatura, as dosagens de 100 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia do nosso estudo equivaleria a aproximadamente 16 mg/Kg/dia e 81 mg/Kg/dia em humanos. Sendo assim, estando muito próximas das descritas nos estudos que avaliam os níveis de exposição humanas aos ftalatos (Heudorf et al. 2007).

Com a exposição ao desregulador endócrino, em relação à evolução e ganho de massa corporal e adiposidade, não foram obtidos nenhuma diferença estatística entre os grupos, no entanto o número amostral de n=3 pode ser a razão de não ter sido observada diferença estatísticas entre os grupos. Isso porque, o DEHP já se mostrou como um modulador seletivo do PPAR γ (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ) *in vitro* (Feige et al. 2007) e do PPAR α , principais mediadores do metabolismo lipídico e da adipogênese (Feige et al. 2007, 2010; Lapinskas et al. 2005). Além disso, em outros estudos como Hao et al. (2013), o DEHP se mostrou capaz de ativar fatores de transcrição, como PPAR γ , C/EBP α (proteínas de ligação ao amplificador de CCAAT) e SRBP1 (fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1), conhecidos por contribuir na adipogênese e estimular o acúmulo de lipídios (Feige et al. 2007, 2010). Além da questão sobre o tamanho amostral, possivelmente a fase da vida onde ocorreu a exposição, período de amamentação, pode ter sido um fator que contribua para os resultado de perda de efeito adipogênico do DEHP, como possível adaptação do metabolismo materno. A mesma relação poderia ser estabelecida no que se refere a ingestão alimentar e a eficiência alimentar (razão entre a ingestão e o ganho de peso), que também não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente.

Nos resultados obtidos, os níveis de glicose circulantes séricos se mostraram aumentados nos grupos tratados, revelando haver alguma desregulação alvo de investigação. As inúmeras atividades metabólicas do período lactacional provocam diminuições nos níveis circulantes de insulina e glicose, com redução da utilização basal de glicose pelos tecidos periféricos, uma vez que a glicose se mostra mais

presente nos tecidos com atividades biossintéticas, como as glândulas mamárias (Burnol et al. 1987). Dessa forma, o período lactacional revela diminuir os níveis de glicose e insulina circulantes. Por outro lado, o DEHP é associado com o aumento dos níveis de glicose, sugerindo ser um potencial causador para a alteração observada (Agius et al. 1979; Burnol et al. 1986), mesmo diante do período lactacional.

Observando outros fatores relacionados com a provável desregulação glicêmica, o transportador GLUT4 (transportador de glicose 4) poderia estar associado, uma vez que sua diminuição é presente em quadros como obesidade e diabetes do tipo 2. Ele é caracterizado como o transportador de glicose e medeia sua captação, estimulada pela insulina com sua fosforilação, em adipócitos e no músculo, conseguindo mover rapidamente a glicose sérica para o meio intracelular, via membrana plasmática (Parsanathan et al. 2013; S. Huang et al. 2007).

Além disso, Parsanathan et al. 2019, mostraram que o DEHP interfere na fosforilação de GLUT4 e alteração em moléculas na sinalização de insulina do coração, na geração F1 pela exposição materna a 100 mg/Kg/dia, durante a lactação. Foi observado um aumento da fosforilação de GLUT4 e conseqüentemente uma diminuição na capacidade da insulina de estimular a captação de glicose em adipócitos. O PPAR α também já foi relacionado com regulação da homeostase glicêmica. Quando há uma estimulação da sua produção, consegue diminuir os níveis proteicos de GLUT4 e o DEHP já se mostrou funcionar como um agonista de PPAR α (Lapinskas et al. 2005). Então sugerimos a possível interferência do contaminante ambiental, DEHP, sobre a homeostase glicêmica materna por ação sobre o GLUT4 ou mesmo sobre o PPAR α , contribuindo para a hiperglicemia de jejum.

O HOMA- β e HOMA-IR são cálculos descritos por Matthews et al (1985) para avaliar a capacidade funcional das células β -pancreáticas em secretar a insulina e para verificar a resistência à insulina, respectivamente. Os cálculos foram avaliados no intuito de verificar a influência do DEHP sobre a homeostase glicêmica. No entanto, de acordo com os resultados sem alteração da insulina, não foram verificadas diferenças que mostram uma influência do contaminante com disfunções

no pâncreas. Dessa forma, o aumento de glicose observado requer maior investigação para identificar qual mecanismo propicia a hiperglicemia evidenciada.

As proteínas AKT (proteína quinase B) e AKT-p (proteína quinase B fosforilada), envolvidas com a via da insulina também foram analisadas. A via Fosfoinositol 3 - quinase (PI3K) / proteína quinase B (AKT) tem um importante papel na fisiologia celular por mediar o crescimento celular além da homeostase glicêmica. No estado alimentado, a insulina é responsável pela sinalização da FoxO1, e conseqüentemente redução da gliconeogênese. A insulina ativa a fosfatidilinositol 3 - quinases (PI3K) produzindo fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP3), a qual ativa a AKT e esta é responsável pela fosforilação da FoxO1 nos resíduos Treonina 25, Serina 253, e portanto leva a inativação da FoxO1 pela exportação nuclear provocando a supressão da gliconeogênese hepática (Lu et al. 2012; Tikhonovich et al. 2013). No experimento Rajesh et al. 2015, expuseram ratas *Wistar* gestantes a 1, 10 e 100 mg/Kg/dia de DEHP, pelo método de gavagem oral do dia 9 ao 21 da gestação. E, com seu trabalho demonstraram o DEHP reduzindo os níveis de AKT na geração F1 dessas ratas. Dessa forma, o ftalato pode estar associado com a interferência na correta supressão da gliconeogênese, sugerindo aumento dos níveis de glicose pela exposição a este desregulador endócrino (Rajesh et al. 2015).

Em nosso modelo, não houve diferenças nos níveis da expressão proteica de AKT e AKT-p analisados, tanto no fígado quanto no tecido adiposo. O que nos sugere que talvez outras proteínas da via da insulina podem estar alteradas pela exposição materna ao DEHP, que não a AKT, e que justifiquem a hiperglicemia observada nessas ratas.

Os resultados do perfil lipídico, por sua vez, mostram os níveis de colesterol do grupo 500 mg/Kg/dia aumentados em relação ao controle e ao grupo 100 mg/Kg/dia. A principal via de eliminação do colesterol do corpo é via conversão do colesterol em ácidos biliares, com posterior eliminação pela excreção fecal. No fígado, a enzima CYP7A1 (colesterol 7-alfa-monooxigenase) é a principal responsável por catalisar a formação dos sais biliares (Repa et al. 2002, Jia et al. 2011). Estudos, por exemplo, mostraram que a exposição entre 50 e 100 μ M de

DEHP, por 3 meses e meio, em células hepáticas, promove ativação da acumulação de colesterol, inibindo a expressão proteica de CYP7A1 (Lee et al. 2020). Além disso, Guo et al. 2023, ao expor hepatócitos humanos (Huh7) a 1 µg/mL de DEHP, observaram, no período de 18 horas, diminuição na expressão de LXRα (receptor nuclear sensível a lipídios), crucial na homeostase do metabolismo do colesterol pela regulação transcricional de CYP7A1. Dessa forma, sugerimos que a ação do DEHP sobre CYP7A1 e/ou LXR esteja relacionada com o aumento do colesterol observado, contribuindo para menor excreção fecal, mesmo sem diferença nas demais frações lipídicas.

Ao observar os resultados dos filhotes PN21, o ganho de massa e o peso relativo do TAB estão reduzidos no grupo de 500 mg/Kg/dia em relação aos demais, assim o seu desenvolvimento saudável parece ter sido prejudicado. A relação, portanto, dos efeitos do DEHP de forma indireta (pelo leite materno) interferindo na diminuição da massa e do TAB nos filhotes PN21, pode sugerir algo. A exposição materna ao DEHP pode reduzir a expressão da prolactina, levando a diminuição da produção do leite (Pengfei et al. 2022). Dessa forma, uma possível redução na produção do leite materno, devido a exposição ao DEHP, poderia estar diretamente relacionada com a redução na massa corporal dos filhotes do grupo 500 mg/Kg/dia, uma vez que os nutrientes, proteínas, lipídios, não estariam sendo devidamente distribuídos através do leite materno para a prole. Portanto, faz-se necessário uma posterior análise de macronutrientes do leite produzido pelas ratas lactantes, no intuito de verificar esta possibilidade.

6. Conclusão

Os dados apresentados revelam uma influência da exposição pelo DEHP no período lactacional, sugerindo desregulação na homeostase lipídica, com aumento do colesterol e na homeostase glicêmica, com quadros de hiperglicemia nas ratas lactantes, sugerindo vias a serem investigadas. Além disso, o desenvolvimento dos filhotes PN21, com a exposição indireta ao DEHP, pelo leite materno, parece estar comprometido. Nesse sentido, implica-se efeitos indiretos do DEHP na diminuição do ganho de massa corporal e da adiposidade que podem comprometer o desenvolvimento saudável desses filhotes.

Assim, a exposição materna ao DEHP exclusivamente durante a lactação pode alterar o metabolismo materno com potenciais consequências sobre o desenvolvimento da prole ao desmame.

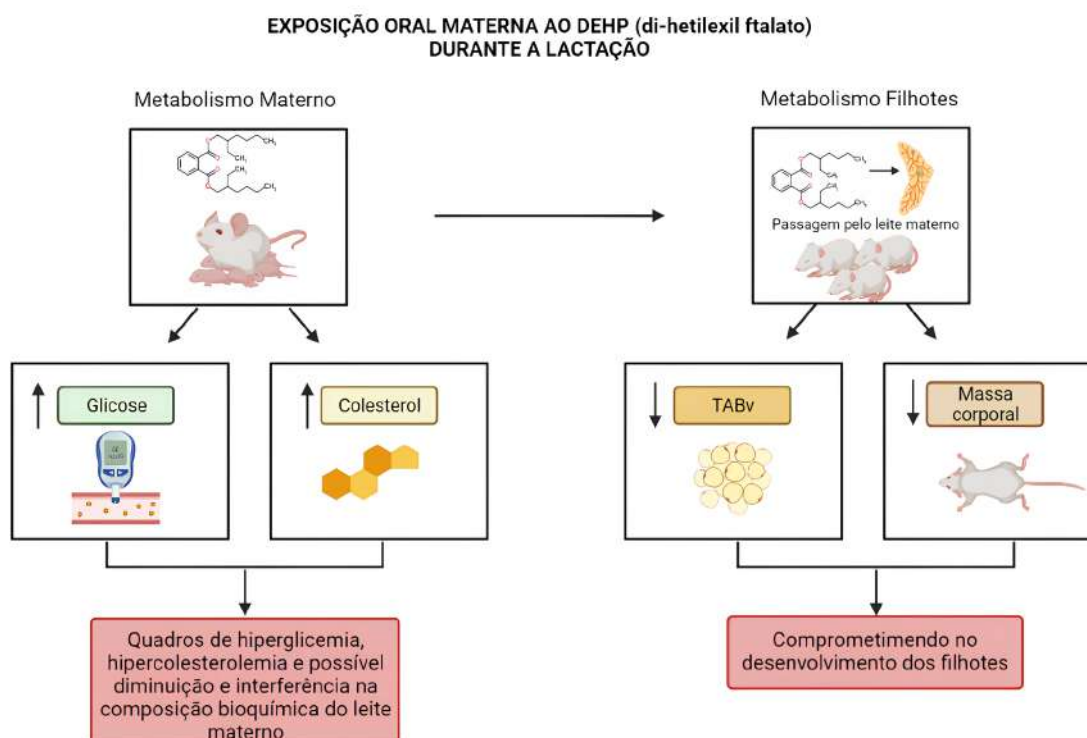


Figura 16. Esquema autoral da discussão e resultados obtidos pela exposição oral materna ao DEHP durante a lactação. Feito pelo BioRender.

7. Referências

Adibi, Jennifer J., Frederica P. Perera, Wieslaw Jedrychowski, David E. Camann, Dana Barr, Ryszard Jacek, and Robin M. Whyatt. 2003. **“Prenatal Exposures to Phthalates among Women in New York City and Krakow, Poland.”** *Environmental Health Perspectives* 111 (14): 1719–22.

Agarwal, D. K., W. H. Lawrence, and J. Autian. 1985. **“Antifertility and Mutagenic Effects in Mice from Parenteral Administration of Di-2-Ethylhexyl Phthalate (DEHP).”** *Journal of Toxicology and Environmental Health* 16 (1): 71–84.

Agarwal, D. K., W. H. Lawrence, J. E. Turner, and J. Autian. 1989. **“Effects of Parenteral Di-(2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP) on Gonadal Biochemistry, Pathology, and Reproductive Performance of Mice.”** *Journal of Toxicology and Environmental Health* 26 (1): 39–59.

Agius, L., A. M. Robinson, J. R. Girard, and D. H. Williamson. 1979. **“Alterations in the Rate of Lipogenesis in Vivo in Maternal Liver and Adipose Tissue on Premature Weaning of Lactating Rats: A Possible Regulatory Role of Prolactin.”** *Biochemical Journal* 180 (3): 689–92.

Albro, P. W., and S. R. Lavenhar. 1989. **“Metabolism of di(2-Ethylhexyl)phthalate.”** *Drug Metabolism Reviews* 21 (1): 13–34.

Albro, P. W., and R. O. Thomas. 1973. **“Enzymatic Hydrolysis of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate by Lipases.”** *Biochimica et Biophysica Acta* 306 (3): 380–90.

Aldyreva, M. V., T. S. Klimova, A. S. Iziumova, and L. A. Timofeevskaja. 1975. **“The effect of phthalate plasticizers on the generative function.”** *Gigiena truda i professional'nye zabolevaniia*, no. 12 (December): 25–29.

Al Salloum, H., J. Saunier, A. Tfayli, and N. Yagoubi. 2016. **“Studying DEHP Migration in Plasticized PVC Used for Blood Bags by Coupling Raman Confocal Microscopy to UV Spectroscopy.”** *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 61 (April): 56–62.

Ballard, Olivia, and Ardythe L. Morrow. 2013. **“Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors.”** *Pediatric Clinics of North America* 60 (1): 49–74.

Baralić, Katarina, Katarina Živančević, Dragana Javorac, Aleksandra Buha Djordjevic, Milena Anđelković, Dragica Jorgovanović, Evica Antonijević Miljaković, et al. 2020. **“Multi-Strain Probiotic Ameliorated Toxic Effects of Phthalates and Bisphenol A Mixture in Wistar Rats.”** *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 143 (September): 111540.

Barker, D. J., T. Forsén, A. Uutela, C. Osmond, and J. G. Eriksson. 2001. "**Size at Birth and Resilience to Effects of Poor Living Conditions in Adult Life: Longitudinal Study.**" *BMJ* 323 (7324): 1273–76.

Barker, D. J. P. 2007. "**The Origins of the Developmental Origins Theory.**" *Journal of Internal Medicine* 261 (5): 412–17.

Bateson, Patrick, David Barker, Timothy Clutton-Brock, Debal Deb, Bruno D'Udine, Robert A. Foley, Peter Gluckman, et al. 2004. "**Developmental Plasticity and Human Health.**" *Nature* 430 (6998): 419–21.

Bautista, C. J., R. J. Bautista, S. Montaña, L. A. Reyes-Castro, O. N. Rodriguez-Peña, C. A. Ibáñez, P. W. Nathanielsz, and E. Zambrano. 2019. "**Effects of Maternal Protein Restriction during Pregnancy and Lactation on Milk Composition and Offspring Development.**" *The British Journal of Nutrition* 122 (2): 141–51.

Bazilio, Fabio Silvestre, George Leon Machado Barros, and Shirley De Mello Pereira Abrantes. 2014. "**Controle Sanitário de Filmes Flexíveis de PVC Comercializados No Estado Do Rio de Janeiro.**" *Vigilância Sanitária Em Debate* 0 (0).

Bellinger, David C. 2013. "**Prenatal Exposures to Environmental Chemicals and Children's Neurodevelopment: An Update.**" *Safety and Health at Work* 4 (1): 1–11.

Bhattacharya, Arjun, Anastasia N. Freedman, Vennela Avula, Rebeca Harris, Weifang Liu, Calvin Pan, Aldons J. Lulis, et al. 2022. "**Placental Genomics Mediates Genetic Associations with Complex Health Traits and Disease.**" *Nature Communications* 13 (1): 706.

Białecka-Florjańczyk, Ewa, and Zbigniew Florjańczyk. 2007. "**Solubility of Plasticizers, Polymers and Environmental Pollution.**" In *Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues*, 397–408. Elsevier.

Botelho, Giuliana G. K., Munisa Golin, Aedra C. Bufalo, Rosana N. Morais, Paulo R. Dalsenter, and Anderson J. Martino-Andrade. 2009. "**Reproductive Effects of di(2-Ethylhexyl)phthalate in Immature Male Rats and Its Relation to Cholesterol, Testosterone, and Thyroxin Levels.**" *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 57 (4): 777–84.

Brewer, H. B., Jr. 2000. "**The Lipid-Laden Foam Cell: An Elusive Target for Therapeutic Intervention.**" *The Journal of Clinical Investigation*.

Bronson, Stefanie L., and Tracy L. Bale. 2016. **“The Placenta as a Mediator of Stress Effects on Neurodevelopmental Reprogramming.”** *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 41 (1): 207–18.

Burnol, A. F., P. Ferre, A. Leturque, and J. Girard. 1987. **“Effect of Insulin on in Vivo Glucose Utilization in Individual Tissues of Anesthetized Lactating Rats.”** *The American Journal of Physiology* 252 (2 Pt 1): E183–88.

Burnol, A. F., A. Leturque, P. Ferré, J. Kande, and J. Girard. 1986. **“Increased Insulin Sensitivity and Responsiveness during Lactation in Rats.”** *The American Journal of Physiology* 251 (5 Pt 1): E537–41.

Caldwell, Jane C. 2012. **“DEHP: Genotoxicity and Potential Carcinogenic Mechanisms-a Review.”** *Mutation Research* 751 (2): 82–157.

Camacho, Luísa, John R. Latendresse, Levan Muskhelishvili, Charles D. Law, and K. Barry Delclos. 2020. **“Effects of Intravenous and Oral di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) and 20% Intralipid Vehicle on Neonatal Rat Testis, Lung, Liver, and Kidney.”** *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 144 (October): 111497.

Chamorro-García, Raquel, Margaret Sahu, Rachelle J. Abbey, Jhyme Laude, Nhieu Pham, and Bruce Blumberg. 2013. **“Transgenerational Inheritance of Increased Fat Depot Size, Stem Cell Reprogramming, and Hepatic Steatosis Elicited by Prenatal Exposure to the Obesogen Tributyltin in Mice.”** *Environmental Health Perspectives* 121 (3): 359–66.

Chaturvedi PR, Decker CJ, Odinecs A. 2001. **“Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery.”** *Curr Opin Chem Biol* 5 : 452-63.

Davis, B. J., R. Weaver, L. J. Gaines, and J. J. Heindel. 1994. **“Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate Suppresses Estradiol Production Independent of FSH-cAMP Stimulation in Rat Granulosa Cells.”** *Toxicology and Applied Pharmacology* 128 (2): 224–28.

Dobrzyńska, Małgorzata M. 2016. **“Phthalates - Widespread Occurrence and the Effect on Male Gametes. Part 1. General Characteristics, Sources and Human Exposure.”** *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* 67 (2): 97–103.

Earls, A. O., I. P. Axford, and J. H. Braybrook. 2003. **“Gas Chromatography-Mass Spectrometry Determination of the Migration of Phthalate Plasticisers from Polyvinyl Chloride Toys and Childcare Articles.”** *Journal of Chromatography. A* 983 (1-2): 237–46.

Feige, Jérôme N., Laurent Gelman, Daniel Rossi, Vincent Zoete, Raphaël Métivier, Cicerone Tudor, Silvia I. Anghel, et al. 2007. **“The Endocrine Disruptor Monoethyl-Hexyl-Phthalate Is a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Modulator That Promotes Adipogenesis.”** *The Journal of Biological Chemistry* 282 (26): 19152–66.

Feige, Jérôme N., Alan Gerber, Cristina Casals-Casas, Qian Yang, Carine Winkler, Elodie Bedu, Manuel Bueno, et al. 2010. **“The Pollutant Diethylhexyl Phthalate Regulates Hepatic Energy Metabolism via Species-Specific PPARalpha-Dependent Mechanisms.”** *Environmental Health Perspectives* 118 (2): 234–41.

Fromme, Hermann, Thomas Kuchler, Thomas Otto, Konstanze Pilz, Josef Müller, and Andrea Wenzel. 2002. **“Occurrence of Phthalates and Bisphenol A and F in the Environment.”** *Water Research* 36 (6): 1429–38.

Gluckman, Peter D., Mark A. Hanson, Cyrus Cooper, and Kent L. Thornburg. 2008. **“Effect of in Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease.”** *The New England Journal of Medicine* 359 (1): 61–73.

Gomes, Rodrigo Mello, Fernanda Giacomini Bueno, Christiano Rodrigues Schamber, João Carlos Palazzo de Mello, Júlio Cezar de Oliveira, Flávio Andrade Francisco, Veridiana Mota Moreira, et al. 2018. **“Maternal Diet-Induced Obesity during Suckling Period Programs Offspring Obese Phenotype and Hypothalamic Leptin/insulin Resistance.”** *The Journal of Nutritional Biochemistry* 61 (November): 24–32.

Grande, Simone W., Anderson J. M. Andrade, Chris E. Talsness, Konstanze Grote, Andrea Golombiewski, Anja Sterner-Kock, and Ibrahim Chahoud. 2007. **“A Dose-Response Study Following in Utero and Lactational Exposure to Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP): Reproductive Effects on Adult Female Offspring Rats.”** *Toxicology* 229 (1-2): 114–22.

Grün, Felix, and Bruce Blumberg. 2009. **“Endocrine Disrupters as Obesogens.”** *Molecular and Cellular Endocrinology* 304 (1-2): 19–29.

Guo BC, Kuo KL, Huang JW, Chen CH, Tarng DC, Lee TS. 2023. "**Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Limits the Lipid-Lowering Effects of Simvastatin by Promoting Protein Degradation of Low-Density Lipoprotein Receptor: Role of PPAR γ -PCSK9 and LXR α -IDOL Signaling Pathways.**" *Antioxidants (Basel)* 12 (2): 477.

Hales, C. N., D. J. Barker, P. M. Clark, L. J. Cox, C. Fall, C. Osmond, and P. D. Winter. 1991. "**Fetal and Infant Growth and Impaired Glucose Tolerance at Age 64.**" *BMJ* 303 (6809): 1019–22.

Hao, Chanjuan, Xuejia Cheng, Jian Guo, Hongfei Xia, and Xu Ma. 2013. "**Perinatal Exposure to Diethyl-Hexyl-Phthalate Induces Obesity in Mice.**" *Frontiers in Bioscience* 5 (2): 725–33.

Hassiotou, Foteini, and Donna Geddes. 2013. "**Anatomy of the Human Mammary Gland: Current Status of Knowledge.**" *Clinical Anatomy* 26 (1): 29–48.

Heindel, Jerrold J., Retha Newbold, and Thaddeus T. Schug. 2015. "**Endocrine Disruptors and Obesity.**" *Nature Reviews. Endocrinology* 11 (11): 653–61.

Holger M Koch, Bernd Rossbach, Hans Drexler, Jürgen Angerer. 2003. "**Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine.**" *Environmental Research* 93 (2): 177-185.

Horseman, N. D. 1999. "**Prolactin and Mammary Gland Development.**" *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 4 (1): 79–88.

Hou, Pengfei, Wenting Dai, Yanshan Jin, Fengqi Zhao, Jianxin Liu, and Hongyun Liu. 2022. "**Maternal Exposure to Di-2-Ethylhexyl Phthalate (DEHP) Depresses Lactation Capacity in Mice.**" *The Science of the Total Environment* 837 (September): 155813.

H.T. Wan, P.Y. Leung, Y.G. Zhao, X. Wei, M.H. Wong, Chris K.C. Wong. 2013. "**Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations.**" *Journal of Hazardous Materials* 261: 763-769.

Huang, Po-Chin, Pao-Lin Kuo, Yue-Liang Guo, Pao-Chi Liao, and Ching-Chang Lee. 2007. "**Associations between Urinary Phthalate Monoesters and Thyroid Hormones in Pregnant Women.**" *Human Reproduction* 22 (10): 2715–22.

Huang, Shaohui, and Michael P. Czech. 2007. "**The GLUT4 Glucose Transporter.**" *Cell Metabolism* 5 (4): 237–52.

Huiying Guo, Xiaobo Zheng, Shuling Ru, Xiaojun Luo, Bixian Mai. 2019. "**The leaching of additive-derived flame retardants (FRs) from plastics in avian**

digestive fluids: The significant risk of highly lipophilic FRs." *Journal of Environmental Sciences*, 85: 200-207.

Hung, Shen-Che, Ting-I Lin, Jau-Ling Suen, Hsien-Kuan Liu, Pei-Ling Wu, Chien-Yi Wu, Yu-Chen S. H. Yang, San-Nan Yang, and Yung-Ning Yang. 2021. **"Phthalate Exposure Pattern in Breast Milk within a Six-Month Postpartum Time in Southern Taiwan."** *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (11): 5726.

Jeon, Seunghwan, Ki-Tae Kim, and Kyungho Choi. 2016. **"Migration of DEHP and DINP into Dust from PVC Flooring Products at Different Surface Temperature."** *The Science of the Total Environment* 547 (March): 441–46.

Jia, Lin, Jenna L. Betters, and Liqing Yu. 2011. **"Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) Protein in Intestinal and Hepatic Cholesterol Transport."** *Annual Review of Physiology* 73: 239–59.

Kim, Jin Hee, Hye Yin Park, Sanghyuk Bae, Youn-Hee Lim, and Yun-Chul Hong. 2013. **"Diethylhexyl Phthalates Is Associated with Insulin Resistance via Oxidative Stress in the Elderly: A Panel Study."** *PloS One* 8 (8): e71392.

Knight, C. H., E. Maltz, and A. H. Docherty. 1986. **"Milk Yield and Composition in Mice: Effects of Litter Size and Lactation Number."** *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology* 84 (1): 127–33.

Koch, Holger M., Hermann M. Bolt, Ralf Preuss, and Jürgen Angerer. 2005. **"New Metabolites of di(2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP) in Human Urine and Serum after Single Oral Doses of Deuterium-Labelled DEHP."** *Archives of Toxicology* 79 (7): 367–76.

Koniecki, Diane, Rong Wang, Richard P. Moody, and Jiping Zhu. 2011. **"Phthalates in Cosmetic and Personal Care Products: Concentrations and Possible Dermal Exposure."** *Environmental Research* 111 (3): 329–36.

Kumar, Manoj, Devojit Kumar Sarma, Swasti Shubham, Manoj Kumawat, Vinod Verma, Anil Prakash, and Rajnarayan Tiwari. 2020. **"Environmental Endocrine-Disrupting Chemical Exposure: Role in Non-Communicable Diseases."** *Frontiers in Public Health* 8 (September): 553850.

La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., Guyton, K. Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V. J., Woodruff, T. J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K. S., Gore, A. C., Zeise, L., & Zoeller, R. T. 2020. **"Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification."** *Nature reviews. Endocrinology*, 16 (1): 45–57.

Langley-Evans, Simon C., and Sarah McMullen. 2010. "**Developmental Origins of Adult Disease.**" *Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre* 19 (2): 87–98.

Lapinskas, Paula J., Sherri Brown, Lisa M. Leesnitzer, Steven Blanchard, Cyndi Swanson, Russell C. Cattley, and J. Christopher Corton. 2005. "**Role of PPAR α in Mediating the Effects of Phthalates and Metabolites in the Liver.**" *Toxicology* 207 (1): 149–63.

Latini, G., C. De Felice, G. Presta, A. Del Vecchio, I. Paris, F. Ruggieri, and P. Mazzeo. 2003. "**Exposure to Di(2-Ethylhexyl)phthalate in Humans during Pregnancy: A Preliminary Report.**" *Biology of the Neonate* 83 (1): 22–24.

Latini, Giuseppe, Claudio De Felice, Giuseppe Presta, Antonio Del Vecchio, Irma Paris, Fabrizio Ruggieri, and Pietro Mazzeo. 2003. "**In Utero Exposure to Di-(2-Ethylhexyl)phthalate and Duration of Human Pregnancy.**" *Environmental Health Perspectives* 111 (14): 1783–85.

Latini, Giuseppe, Francesco Gallo, and Lorenzo Iughetti. 2010. "**Toxic Environment and Obesity Pandemia: Is There a Relationship?**" *Italian Journal of Pediatrics* 36 (January): 8.

Le Moal, Joëlle, Richard M. Sharpe, Niels Jørgensen, Hagai Levine, Joanna Jurewicz, Jaime Mendiola, Shanna H. Swan, et al. 2016. "**Toward a Multi-Country Monitoring System of Reproductive Health in the Context of Endocrine Disrupting Chemical Exposure.**" *European Journal of Public Health* 26 (1): 76–83.

Lee, C. Y., Suk, F. M., Twu, Y. C., & Liao, Y. J. 2020. "**Long-Term Exposure to Low-Dose Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Impairs Cholesterol Metabolism in Hepatic Stellate Cells and Exacerbates Liver Fibrosis.**" *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 3802.

Lind, P. Monica, and Lars Lind. 2018. "**Endocrine-Disrupting Chemicals and Risk of Diabetes: An Evidence-Based Review.**" *Diabetologia* 61 (7): 1495–1502.

Liu, Xiuzhen, Ana M. Adamo, and Patricia I. Oteiza. 2022. "**Di-2-Ethylhexyl Phthalate Affects Zinc Metabolism and Neurogenesis in the Developing Rat Brain.**" *Archives of Biochemistry and Biophysics* 727 (September): 109351.

Lu, Mingjian, Min Wan, Karla F. Leavens, Qingwei Chu, Bobby R. Monks, Sully Fernandez, Rexford S. Ahima, Kohjiro Ueki, C. Ronald Kahn, and Morris J. Birnbaum. 2012. "**Insulin Regulates Liver Metabolism in Vivo in the Absence of Hepatic Akt and Foxo1.**" *Nature Medicine* 18 (3): 388–95.

Luo, Yu, Xue-Nan Li, Yi Zhao, Zheng-Hai Du, and Jin-Long Li. 2019. "**DEHP**

Triggers Cerebral Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Quail (*Coturnix Japonica*) via Modulating Mitochondrial Dynamics and Biogenesis and Activating Nrf2-Mediated Defense Response.” *Chemosphere* 224 (June): 626–33.

Lu, Yu-Shun, Gui-Xiao Yao, Xin-Lu Wang, Jia-Xi Liu, Jiang Yu, Jing Qiu, Yun Li, Yong-Zhong Qian, and Yan-Yang Xu. 2020. **“A Comprehensive Analysis of Metabolomics and Transcriptomics Reveals New Biomarkers and Mechanistic Insights on DEHP Exposures in MCF-7 Cells.”** *Chemosphere* 255 (September): 126865.

Lv, Ziquan, Jinquan Cheng, Suli Huang, Yanwei Zhang, Shuang Wu, Yangshen Qiu, Yijie Geng, et al. 2016. **“DEHP Induces Obesity and Hypothyroidism through Both Central and Peripheral Pathways in C3H/He Mice.”** *Obesity* 24 (2): 368–78.

Maloney, E. K., and D. J. Waxman. 1999. **“Trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by Structurally Diverse Environmental Chemicals.”** *Toxicology and Applied Pharmacology* 161 (2): 209–18.

Maradonna, Francesca, Laura N. Vandenberg, and Rosaria Meccariello. 2022. **“Editorial: Endocrine-Disrupting Compounds in Plastics and Their Effects on Reproduction, Fertility, and Development.”** *Frontiers in Toxicology* 4 (March): 886628.

Martinez-Arguelles, Daniel B., Theodore Guichard, Martine Culty, Barry R. Zirkin, and Vassilios Papadopoulos. 2011. **“In Utero Exposure to the Antiandrogen Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate Decreases Adrenal Aldosterone Production in the Adult Rat.”** *Biology of Reproduction* 85 (1): 51–61.

Martinez-Arguelles, D. B., M. Culty, B. R. Zirkin, and V. Papadopoulos. 2009. **“In Utero Exposure to Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate Decreases Mineralocorticoid Receptor Expression in the Adult Testis.”** *Endocrinology* 150 (12): 5575–85.

Martino-Andrade, Anderson Joel, and Ibrahim Chahoud. 2010. **“Reproductive Toxicity of Phthalate Esters.”** *Molecular Nutrition & Food Research* 54 (1): 148–57.

Martín-Pozo, Laura, Blanca de Alarcón-Gómez, Rocío Rodríguez-Gómez, María Teresa García-Córcoles, Morsina Çipa, and Alberto Zafra-Gómez. 2019. **“Analytical Methods for the Determination of Emerging Contaminants in Sewage Sludge Samples. A Review.”** *Talanta* 192 (January): 508–33.

Masso-Welch, P. A., K. M. Darcy, N. C. Stangle-Castor, and M. M. Ip. 2000. **“A Developmental Atlas of Rat Mammary Gland Histology.”** *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5 (2): 165–85.

Mcnamara, J. 1995. **“Role and Regulation of Metabolism in Adipose Tissue**

- during Lactation.” *The Journal of Nutritional Biochemistry* 6 (3): 120–29.
- Mersiowsky, I., M. Weller, and J. Ejlertsson. 2001. “**Fate of Plasticised PVC Products under Landfill Conditions: A Laboratory-Scale Landfill Simulation Reactor Study.**” *Water Research* 35 (13): 3063–70.
- Moskalev, Alexey A., Alexander M. Aliper, Zeljka Smit-McBride, Anton Buzdin, and Alex Zhavoronkov. 2014. “**Genetics and Epigenetics of Aging and Longevity.**” *Cell Cycle* 13 (7): 1063–77.
- Motil, K. J., M. Thotathuchery, C. M. Montandon, D. L. Hachey, T. W. Boutton, P. D. Klein, and C. Garza. 1994. “**Insulin, Cortisol and Thyroid Hormones Modulate Maternal Protein Status and Milk Production and Composition in Humans.**” *The Journal of Nutrition* 124 (8): 1248–57.
- Munksgaard, Erik Christian. 2004. “**Leaching of Plasticizers from Temporary Denture Soft Lining Materials.**” *European Journal of Oral Sciences* 112 (1): 101–4.
- Parsanathan, Rajesh, Angelaalincy Maria Joseph, and Balasubramanian Karundevi. 2019. “**Postnatal Exposure to Di-(2-Ethylhexyl)phthalate Alters Cardiac Insulin Signaling Molecules and GLUT4 Phosphorylation in Male Rat Offspring.**” *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (4): 5802–12.
- Picó, Catalina, Flávio Reis, Conceição Egas, Paulo Mathias, and Paulo Matafome. 2021. “**Lactation as a Programming Window for Metabolic Syndrome.**” *European Journal of Clinical Investigation* 51 (5): e13482.
- Pillay, Jaclyn, and Tammy J. Davis. 2022. “**Physiology, Lactation.**” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Qadeer, Abdul, Kelly L. Kirsten, Zeeshan Ajmal, Xia Jiang, and Xingru Zhao. 2022. “**Alternative Plasticizers As Emerging Global Environmental and Health Threat: Another Regrettable Substitution?**” *Environmental Science & Technology* 56 (3): 1482–88.
- Radke, Elizabeth G., Audrey Galizia, Kristina A. Thayer, and Glinda S. Cooper. 2019. “**Phthalate Exposure and Metabolic Effects: A Systematic Review of the Human Epidemiological Evidence.**” *Environment International* 132 (November): 104768.
- Rajesh, Parsanathan, Sampath Sathish, Chinnapaiyan Srinivasan, Jayaraman Selvaraj, and Karundevi Balasubramanian. 2013. “**Phthalate Is Associated with Insulin Resistance in Adipose Tissue of Male Rat: Role of Antioxidant Vitamins.**” *Journal of Cellular Biochemistry* 114 (3): 558–69.
- Rajesh, P., and K. Balasubramanian. 2015. “**Gestational Exposure to di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Impairs Pancreatic β -Cell Function in F1 Rat**

Offspring. *Toxicology Letters* 232 (1): 46–57.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. 2008. **“Dose translation from animal to human studies revisited.”** *FASEB J* 22 (3): 659-61.

Rebuffé-Scrive, M., L. Enk, N. Crona, P. Lönnroth, L. Abrahamsson, U. Smith, and P. Björntorp. 1985. **“Fat Cell Metabolism in Different Regions in Women. Effect of Menstrual Cycle, Pregnancy, and Lactation.”** *The Journal of Clinical Investigation* 75 (6): 1973–76.

Repa, Joyce J., and David J. Mangelsdorf. 2002. **“The Liver X Receptor Gene Team: Potential New Players in Atherosclerosis.”** *Nature Medicine* 8 (11): 1243–48.

Rhomberg LR, Lewandowski TA. 2006. **“Methods for identifying a default cross-species scaling factor.”** *Hum Ecol Risk Assess* 12:1094-127.

Rodríguez-González, Guadalupe L., Claudia J. Bautista, Karen I. Rojas-Torres, Peter W. Nathanielsz, and Elena Zambrano. 2020. **“Importance of the Lactation Period in Developmental Programming in Rodents.”** *Nutrition Reviews* 78 (Suppl 2): 32–47.

Rowdhwal, Sai Sandeep Singh, and Jiaxiang Chen. 2018. **“Toxic Effects of Di-2-Ethylhexyl Phthalate: An Overview.”** *BioMed Research International* 2018 (February): 1750368.

Schmidt, Juliane-Susanne, Kristina Schaedlich, Nadia Fiandanese, Paola Pocar, and Bernd Fischer. 2012. **“Effects of di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Female Fertility and Adipogenesis in C3H/N Mice.”** *Environmental Health Perspectives* 120 (8): 1123–29.

Shelby, Michael D. 2006. **“NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP).”** *NTP CERHR MON*, no. 18 (November): v, vii – 7, II – iii – xiii passim.

Silva, Manori J., Ella Samandar, James L. Preau Jr, Larry L. Needham, and Antonia M. Calafat. 2006. **“Urinary Oxidative Metabolites of di(2-Ethylhexyl) Phthalate in Humans.”** *Toxicology* 219 (1-3): 22–32.

Silva, M. J., J. A. Reidy, A. R. Herbert, J. L. Preau Jr, L. L. Needham, and A. M. Calafat. 2004. **“Detection of Phthalate Metabolites in Human Amniotic Fluid.”** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72 (6): 1226–31.

Sjöberg, P., N. G. Lindqvist, and L. Plöen. 1986. **“Age-Dependent Response of the Rat Testes to di(2-Ethylhexyl) Phthalate.”** *Environmental Health Perspectives* 65

(March): 237–42.

Souza, Luana L., Egberto G. Moura, and Patricia C. Lisboa. 2022. "**Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring.**" *Nutrients* 14 (10).

Sun, Cong-Cong, Shuai Zhao, Ling-Luo Chu, Shan-Yu Zhang, Yan-Ling Li, Mei-Fang Sun, Qu-Nan Wang, et al. 2022. "**Di (2-Ethyl-Hexyl) Phthalate Disrupts Placental Growth in a Dual Blocking Mode.**" *Journal of Hazardous Materials* 421 (January): 126815.

Waard, M., Brands, B., Kouwenhoven, S. M. P., Lerma, J. C., Crespo-Escobar, P., Koletzko, B., Zalewski, B. M., & van Goudoever, J. B. 2017. "**Optimal nutrition in lactating women and its effect on later health of offspring: A systematic review of current evidence and recommendations.**" *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 57(18): 4003-4016.

Tapia-Orozco, Natalia, Ricardo Ibarra-Cabrera, Alberto Tecante, Miquel Gimeno, Roberto Parra, and Roeb Garcia-Arrazola. 2016. "**Removal Strategies for Endocrine Disrupting Chemicals Using Cellulose-Based Materials as Adsorbents: A Review.**" *Journal of Environmental Chemical Engineering* 4 (3): 3122–42.

Tedner, S. G., A. K. Örtqvist, and C. Almqvist. 2012. "**Fetal Growth and Risk of Childhood Asthma and Allergic Disease.**" *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 42 (10): 1430–47.

Tikhanovich, Irina, Josiah Cox, and Steven A. Weinman. 2013. "**Forkhead Box Class O Transcription Factors in Liver Function and Disease.**" *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28 Suppl 1 (0 1): 125–31.

Tüzüm Demir, A. P., and S. Ulutan. 2012. "**Migration of Phthalate and Non-Phthalate Plasticizers out of Plasticized PVC Films into Air.**" *Journal of Applied Polymer Science*.

Ursel Heudorf, Volker Mersch-Sundermann, Jürgen Angerer. 2007. "**Phthalates: Toxicology and exposure.**" *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210 (5): 623-634.

USFDA. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Adult Healthy Volunteer. 2005. Rockville, MD: US Food and Drug Administration.

Venturelli, Amanda Caroline, Katlyn Barp Meyer, Stefani Valéria Fischer, Diogo

Henrique Kita, Rafaela Adams Philipsen, Rosana Nogueira Morais, and Anderson Joel Martino Andrade. 2019. **“Effects of in Utero and Lactational Exposure to Phthalates on Reproductive Development and Glycemic Homeostasis in Rats.”** *Toxicology* 421 (June): 30–40.

Vernon, R. G. 1989. **“Endocrine Control of Metabolic Adaptation during Lactation.”** *The Proceedings of the Nutrition Society* 48 (1): 23–32.

V.I. Triantafyllou, K. Akrida-Demertzi, P.G. Demertzis. 2007. **“A study on the migration of organic pollutants from recycled paperboard packaging materials to solid food matrices.”** *Food Chemistry*, 101(4): 1759-1768.

Wolf, C., Jr, C. Lambright, P. Mann, M. Price, R. L. Cooper, J. Ostby, and L. E. Gray Jr. 1999. **“Administration of Potentially Antiandrogenic Pesticides (procymidone, Linuron, Iprodione, Chlozolate, P,p'-DDE, and Ketoconazole) and Toxic Substances (dibutyl- and Diethylhexyl Phthalate, PCB 169, and Ethane Dimethane Sulphonate) during Sexual Differentiation Produces Diverse Profiles of Reproductive Malformations in the Male Rat.”** *Toxicology and Industrial Health* 15 (1-2): 94–118.

Wolterbeek, André, Thies Oosterwijk, Steffen Schneider, Robert Landsiedel, Didima de Groot, Renz van Ee, Mariëlle Wouters, and Han van de Sandt. 2015. **“Oral Two-Generation Reproduction Toxicity Study with NM-200 Synthetic Amorphous Silica in Wistar Rats.”** *Reproductive Toxicology* 56 (August): 147–54.

Xu, Zhaoni, Xiong Xiong, Yanhui Zhao, Wu Xiang, and Chenxi Wu. 2020. **“Pollutants Delivered Every Day: Phthalates in Plastic Express Packaging Bags and Their Leaching Potential.”** *Journal of Hazardous Materials* 384 (February): 121282.

Yilmaz, Bayram, Hakan Terekeci, Suleyman Sandal, and Fahrettin Kelestimur. 2020. **“Endocrine Disrupting Chemicals: Exposure, Effects on Human Health, Mechanism of Action, Models for Testing and Strategies for Prevention.”** *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 21 (1): 127–47.

Zoeller, R. Thomas, Åke Bergman, Georg Becher, Poul Bjerregaard, Riana Bornman, Ingvar Brandt, Taisen Iguchi, et al. 2016. **“The Path Forward on Endocrine Disruptors Requires Focus on the Basics.”** *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*.

Zong, Teng, Lidan Lai, Jia Hu, Meijun Guo, Mo Li, Lu Zhang, Chengxue Zhong, et al. 2015. **“Maternal Exposure to Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate Disrupts Placental Growth and Development in Pregnant Mice.”** *Journal of Hazardous Materials* 297 (October): 25–33.