



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

FERNANDA LUIZA GUINOSSI BARBOSA DEAK

BISFENOL A E SEUS IMPACTOS TÓXICOS NA REPRODUÇÃO

FERNANDA LUIZA GUINOSSI BARBOSA DEAK

BISFENOL A E SEUS IMPACTOS TÓXICOS NA REPRODUÇÃO

Defesa de Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:
Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho

636.089
D278b Deak, Fernanda Luiza Guinossi Barbosa.
 Bisfenol A e seus impactos tóxicos na reprodução /
 Fernanda Luiza Guinossi Barbosa. – Presidente
 Prudente, 2026.
 67f.: il.

 Tese (Doutorado em Fisiopatologia Animal) -
 Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
 Prudente, SP, 2026.
 Bibliografia.
 Orientador: Anthony César de Souza Castilho.

 1. Bisfenol A. 2. Produção de embrião. 3.
 Desregulador endócrino. I. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mogni – CRB 8-6204

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "BISFENOL A E SEUS IMPACTOS TÓXICOS NA REPRODUÇÃO"

AUTOR(A): FERNANDA LUIZA GUINOSSI BARBOSA DEAK

ORIENTADOR(A): Prof. Dr. ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR(A) em
FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL

Área de Concentração FISIOPATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. MARILICE ZUNDT ASTOLPHI

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. RENATA CALCIOLARI ROSSI

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. ISABELA BAZZO DA COSTA

UNIMAR - Universidade de Marília (SP)

Profa. Dra. ISABELE PICADA EMANUELLI

UNICESUMAR - Universidade Cesumar / Maringá (PR)

Data da realização: Presidente Prudente, 27 de março de 2026.

Central de Assinaturas Eletrônicas

Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico
Status do documento: Concluído
Data de criação do documento: 01/04/2026 10:37
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília
Número de assinaturas: 5
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6476871)

Signatários do documento

MARILICE ZUNDT ASTOLPHI (PROFESSOR)

mari@unoeste.br
Recebido em 01/04/2026 10:37
Assinado em 01/04/2026 11:25
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.33.2
ID da assinatura: 6515824

ANTHONY CESAR DE SOUZA CASTILHO (PROFESSOR)

castilho.anthony@gmail.com
Recebido em 01/04/2026 10:37
Assinado em 01/04/2026 16:25
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.32.97
ID da assinatura: 6515823

RENATA CALCICOLARI ROSSI (PROFESSOR)

renata@unoeste.br
Recebido em 01/04/2026 10:37
Assinado em 01/04/2026 12:06
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.131.32.97
ID da assinatura: 6515825

ISABELE PICADA EMANUELLI (SIGNATÁRIO EXTERNO)

isabelevet@gmail.com
Recebido em 01/04/2026 10:37
Assinado em 01/04/2026 15:07
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 177.129.72.63
ID da assinatura: 6515827

ISABELA BAZZO DA COSTA (SIGNATÁRIO EXTERNO)

isabelabazzo@unimar.br
Recebido em 01/04/2026 10:37
Assinado em 01/04/2026 18:39
Assinatura Interna UNOESTE
Usando endereço IP: 2804:18:ca:2800:3953:2dd2:510f:3897
ID da assinatura: 6515826

URL do documento: <https://www.unoeste.br/ca/e9181588>

Assinatura digital do documento: c94db3e83df4bd60275acda2c01e646c283b28d3529537de1803f6a4b69d1891

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela EPEC - Empresa Prudentina de Educação e Cultura SA

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



DEDICATÓRIA

Dedico a minha família, que sempre me apoiou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento as minhas forças e me conceder disposição e discernimento durante essa longa jornada.

Ao meu marido Danilo, pelo amor, companheirismo e paciência quando eu achava que tudo estava perdido.

Agradeço aos meus pais, Rogéria e Luiz, que sempre me apoiaram, não medindo esforços para me ajudar e me incentivar nos estudos.

Ao meu irmão Mateus, pela amizade, parceria e ajuda.

Aos meus avós maternos, Carlos e Zenilda e por todo amor e incentivo, por falar com tanto orgulho de mim para as outras pessoas e aos meus avós paternos Luiz e Conceição (in memoriam), pelo legado do campo, que influenciou diretamente na escolha de minha profissão.

Agradeço meus colegas de trabalho, Ades, Fran e Thiago, obrigada pela amizade, e por todo auxílio que me proporcionaram ao longo desta caminhada.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho, por acreditar que nada estava perdido e, apesar das adversidades, aceitou o desafio de me orientar, tornando-me uma profissional melhor.

Agradeço aos professores do Doutorado, que contribuíram de forma direta e indireta na minha formação profissional.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil) – Código de Financiamento 001, pela bolsa de estudo concedida durante meu doutorado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou a pesquisa (números de bolsa: 2020/08747-1).

À UNOESTE e todos os Professores que me auxiliaram nessa jornada.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

Bisfenol A e seus impactos tóxicos na reprodução

O Bisfenol A (BPA), amplamente utilizado em plásticos e resinas epóxi, representa preocupação devido à sua capacidade de interferir sobre a fisiologia reprodutiva, desenvolvimento embrionário e mecanismos moleculares associados à sua toxicidade como desregulador endócrino. A revisão integrativa de literatura, sistematiza evidências experimentais *in vivo* e *in vitro* sobre embriotoxicidade, efeitos gonadais, vias moleculares e transgeracionalidade associados à exposição ao BPA. Os resultados indicam que a exposição ao composto compromete o desenvolvimento embrionário desde as fases iniciais, reduzindo taxas de clivagem e formação de blastocistos, além de aumentar a apoptose e o estresse oxidativo. Observa-se ainda disfunção mitocondrial e alterações metabólicas que afetam diretamente a competência embrionária. Em relação aos efeitos gonadais, há redução da qualidade oocitária, alterações na maturação meiótica, desorganização do fuso, atresia folicular e disfunção da esteroidogênese ovariana. Em nível molecular, o BPA atua principalmente por ligação a receptores estrogênicos, indução de espécies reativas de oxigênio, modulação de vias apoptóticas e alterações epigenéticas. Evidências adicionais apontam efeitos transgeracionais, com impactos reprodutivos observados em gerações não diretamente expostas, sugerindo reprogramação epigenética persistente. O artigo de caráter experimental, utiliza o modelo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos para investigar os efeitos de diferentes concentrações de BPA sobre a progressão meiótica, homeostase celular e desenvolvimento embrionário subsequente. Os achados demonstram que concentrações elevadas de BPA durante a maturação oocitária prejudicam a competência de desenvolvimento, comprometendo a função mitocondrial, aumentando os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio e alterando a organização citosquelética e o alinhamento cromossômico. Tais alterações resultam em maior incidência de aneuploidia, redução da viabilidade embrionária e menor eficiência no desenvolvimento pós-fertilização. Os estudos evidenciam que o BPA exerce toxicidade reprodutiva multifatorial, envolvendo desregulação endócrina, estresse oxidativo, disfunções mitocondriais, alterações epigenéticas e prejuízos na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário. Além disso, reforçam que

mesmo exposições ao BPA podem desencadear efeitos biológicos significativos e duradouros. Dessa forma, os achados contribuem para o avanço do entendimento do mecanismo da toxicidade do BPA e destacam sua relevância como fator de risco ambiental para a fertilidade, a competência embrionária e a saúde reprodutiva ao longo das gerações.

Palavras-chave: Bisfenol A; embrião; reprodução; revisão integrativa; desregulador endócrino; estresse oxidativo; oócitos; produção de embriões.

ABSTRACT

Bisphenol A and its toxic impacts on reproduction

Bisphenol A (BPA), widely used in plastics and epoxy resins, is a concern due to its ability to interfere with reproductive physiology, embryonic development, and molecular mechanisms associated with its toxicity as an endocrine disruptor. This integrative literature review systematizes *in vivo* and *in vitro* experimental evidence on embryotoxicity, gonadal effects, molecular pathways, and transgenerationality associated with BPA exposure. The results indicate that exposure to the compound compromises embryonic development from the early stages, reducing cleavage rates and blastocyst formation, as well as increasing apoptosis and oxidative stress. Mitochondrial dysfunction and metabolic alterations that directly affect embryonic competence are also observed. Regarding gonadal effects, there is a reduction in oocyte quality, alterations in meiotic maturation, spindle disorganization, follicular atresia, and ovarian steroidogenesis dysfunction. At the molecular level, BPA acts primarily by binding to estrogen receptors, inducing reactive oxygen species, modulating apoptotic pathways, and causing epigenetic alterations. Further evidence points to transgenerational effects, with reproductive impacts observed in generations not directly exposed, suggesting persistent epigenetic reprogramming. This experimental article uses an *in vitro* bovine oocyte maturation model to investigate the effects of different concentrations of BPA on meiotic progression, cellular homeostasis, and subsequent embryonic development. The findings demonstrate that elevated concentrations of BPA during oocyte maturation impair developmental competence, compromising mitochondrial function, increasing intracellular levels of reactive oxygen species, and altering cytoskeletal organization and chromosome alignment. These alterations result in a higher incidence of aneuploidy, reduced embryonic viability, and lower post-fertilization developmental efficiency. Studies show that BPA exerts multifactorial reproductive toxicity, involving endocrine disruption, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, epigenetic alterations, and impairments in oocyte maturation and embryonic development. Furthermore, they reinforce that even exposure to BPA can trigger significant and lasting biological effects. Thus, these findings contribute to advancing the understanding of the mechanism of BPA toxicity and highlight its relevance as an

environmental risk factor for fertility, embryonic competence, and reproductive health across generations.

Keywords: Bisphenol A; embryo; reproduction; integrative review; endocrine disruptor; oxidative stress; oocytes; embryo production.

LISTA DE SIGLAS

°C	– Graus Celsius
µg	– Micrograma
µL	– Microlitro
µL	– Microlitro
µM	– Micrômetro
AMPK	– Proteína Quinase Ativada por AMP
ANOVA	– Análise de variância
BAX	– <i>Bcl-2 associated protein X</i>
BCL-2	– <i>B-cell lymphoma 2</i>
BPA	– Bisfenol A
BSA	– Albumina Sérica Bovina
CAPES	– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CO ₂	– Dióxido de carbono
COC	– Complexo Cumulus-Oócito
CRV	– <i>Cooperatie Rundvee Verbetering</i>
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
EDC	– <i>Endocrine-disrupting chemical</i>
EGF	– Fator de Crescimento Epidérmico
ER	– Receptores de estrogênio
F1	– Primeira Filial
F2	– Segunda Filial
F3	– Terceira Filial
FAPESP	– Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	– <i>Food and Drugs Administration</i>
FSH	– Hormônio Folículo-Estimulante
g	– Grama
GJIC	– Lacuna comunicação intercelular juncional
h	– Hora
ICSI	– <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i>
IU	– Unidade internacional
IVF	– <i>In vitro fertilization</i>
IVM	– <i>In vitro maturation</i>
JMP	– <i>John's Macintosh Project</i>

LAS	– <i>Leica Application Suite</i>
LH	– Hormônio Luteinizante
MD	– <i>Maryland</i>
mg	– Miligrama
MII	– Metáfase II
min	– Minuto
ml	– Mililitro
mm	– Milímetro
MMP	– <i>Mitochondrial membrane potential</i>
MO	– <i>Missouri</i>
mTOR	– Alvo da Rapamicina em Mamíferos
n	– Número
NC	– <i>North Carolina</i>
ng	– Nanograma
NHANES	– <i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
ODS	– Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OH	– Hidroxila
ONU	– Organização das Nações Unidas
P	– Probabilidade
PBS	– Solução Salina Tamponada com Fosfato
pH	– Potencial hidrogeniônico
PHE	– <i>Penicillamine–hypotaurine–epinephrine</i>
PVP	– <i>Polyvinylpyrrolidone</i>
RI	– Revisão Integrativa
RNA	– Ácido ribonucleico
ROS	– <i>Reactive oxygen species</i>
s	– Segundo
SOF	– <i>Synthetic Oviduct Fluid</i>
SOFaa	– <i>Synthetic Oviduct Fluid with amino acids</i>
TALP	– <i>Albumin–lactate–146 pyruvate</i>
TCM - 199	– <i>Tissue Culture Medium 199</i>
USA	– Estados Unidos da América
v/v	– Volume/volume
W	– <i>West</i>

SUMÁRIO

IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA.....	17
ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	17
ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	40
ANEXO A - NORMAS DA REVISTA <i>ANIMAL REPRODUCTION</i>.....	60

IMPACTO POTENCIAL DESSA PESQUISA

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Ao investigar como o BPA compromete mecanismos celulares, metabólicos e reprodutivos, o estudo contribui diretamente para a segurança e sustentabilidade da produção animal, uma vez que a eficiência reprodutiva bovina está diretamente ligada à oferta de alimentos, renda rural e estabilidade econômica. Do ponto de vista científico, a pesquisa aprofunda a compreensão de vias oxidativas, danos mitocondriais e alterações epigenéticas induzidas por contaminantes ambientais, fortalecendo a base para políticas regulatórias e estratégias de mitigação. Socialmente, seus resultados podem subsidiar ações de saúde pública ao evidenciar riscos de exposição humana a compostos que ingressam na cadeia alimentar. No âmbito tecnológico e da inovação, o estudo abre caminho para o desenvolvimento de biossensores, protocolos de reprodução assistida mais resilientes ao estresse oxidativo e substituição de materiais contendo BPA por alternativas seguras, impulsionando práticas produtivas sustentáveis e responsáveis. Dessa forma, a pesquisa conecta ciência de ponta, impacto socioeconômico e inovação, contribuindo de modo efetivo para sistemas agropecuários mais seguros, saudáveis e alinhados à sustentabilidade global.

O presente estudo se encaixa em diferentes objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) da ONU, destacando-se:

ODS 2 – (Fome zero e agricultura sustentável): contribui para a melhoria da eficiência produtiva e para o avanço de tecnologias sustentáveis.

ODS 3 – (Saúde e bem-estar): evidencia riscos de exposição humana a compostos contaminantes presentes na cadeia alimentar.

ODS 9 – (Indústria, inovação e infraestrutura): promove práticas produtivas sustentáveis e responsáveis.

ODS 12 – (Consumo e produção responsáveis): assegurar padrões de consumo sustentáveis.

ARTIGO CIENTÍFICO 1 – A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA***ANIMAL REPRODUCTION*****Bisfenol A e suas implicações reprodutivas: uma Revisão Integrativa**

Fernanda Luiza Guinossi Barbosa Deak¹(<https://orcid.org/0000-0002-7917-8770>),

Anthony César de Souza Castilho¹ (<https://orcid.org/0000-0003-1666-7021>)

¹ Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Departamento de Ciência Animal, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

*Correspondência: fernandadeak@gmail.com

RESUMO

O bisfenol A (BPA) é um monômero utilizado na produção de policarbonato, um polímero comumente encontrado em plásticos, resinas epóxi e papéis térmicos. O BPA tem sido considerado um desregulador endócrino, pois além de alterar a ação do sistema endócrino em glândulas como tireoide, hipotálamo e hipófise, e atuar em certos processos reprodutivos, sua molécula é semelhante ao hormônio estradiol, resultando na capacidade de impactar negativamente no sistema endócrino; podendo afetar significativamente a fisiologia reprodutiva. A presente investigação é uma revisão integrativa que teve como objetivo sistematizar o conhecimento produzido acerca da capacidade do Bisfenol A interferir prejudicialmente no sistema endócrino, podendo afetar significativamente a fisiologia reprodutiva e conseqüentemente interferir no desenvolvimento embrionário. A metodologia adotada baseou-se na base de dados *Pub Med*. Foram utilizados os descritores controlados “bisphenol A”, “embryo” e “reproduction”, no idioma inglês, entre 2003 e 2023. Foram selecionados seis artigos. O BPA exerce efeitos tóxicos multifatoriais sobre a saúde reprodutiva, comprometendo a

58 competência oocitária e a qualidade embrionária, com repercussões persistentes e
59 potencial impacto transgeracional. Os dados deste estudo contribuem para melhor
60 compreensão dos mecanismos de subsequente mediação parental e efeitos tóxicos
61 geracionais do BPA.

62

63 **Palavras-chave:** Bisfenol A; embrião; reprodução; revisão integrativa.

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82 INTRODUÇÃO

83

84 Compostos desreguladores endócrinos são capazes de interferir nas vias
85 celulares, particularmente vias que regulam os processos reprodutivos e estão ligadas a
86 efeitos na saúde (Alavian-Ghavanini et al., 2018). O composto desregulador mais
87 conhecido que está sob escrutínio para seu uso generalizado, exposição crônica e
88 inúmeros efeitos adversos é um plastificante comum, conhecido como bisfenol A
89 (BPA). O bisfenol A é um monômero utilizado na produção de policarbonato, um
90 polímero comumente encontrado em plásticos, resinas epóxi e papéis térmicos. O BPA
91 é sintético agonista de estrogênio usado na fabricação de produtos de uso diário. Pode
92 ser detectado em animais e humanos em quase todos os sistemas, órgãos, tecidos,
93 células e está ligado a consequências destrutivas na fertilidade feminina, como doenças
94 e cânceres (Cao et al., 2018). A presença de BPA em alimentos e água, tem sido motivo
95 de grande preocupação nos últimos anos, não só devido a questões ambientais e
96 ecológicas, mas também ao suposto risco para a saúde pública relacionado ao seu
97 potencial mutagênico e carcinogênico. (Scopel et al., 2020).

98 O BPA foi descrito pela primeira vez por Aleksandr P. Dianin em 1891 e
99 sintetizado por Thomas Zincke em 1905 (Jalal et al., 2018). Após a descoberta deste
100 químico, estudos revelaram sua capacidade de formar ligações cruzadas na
101 polimerização do plástico policarbonato. Desde então, o BPA tem sido usado na
102 fabricação de policarbonato que começou no ano de 1957 nos Estados Unidos. Mais
103 tarde, foram relatadas as propriedades estrogênicas do BPA, que estão intimamente
104 relacionados com a presença de grupos OH na posição de sua estrutura química (Dodds
105 e Lawson, 1936; Sodré et al., 2007; Kusvuran e Yildirim, 2013).

106 O BPA tem sido associado ao aumento de recrutamento de folículos primordiais,
107 diminuição do número de oócitos viáveis e diminuição do crescimento folicular antral
108 (Gore et al., 2015). A grande preocupação nos últimos anos tem sido o fato de que o
109 BPA pode migrar para os alimentos durante a embalagem e existem vários relatos
110 indicando que humanos e animais selvagens podem sofrer efeitos adversos da exposição
111 ao BPA (Goloubkova e Spritzer, 2000; Bernardo et al., 2015). Esta migração pode
112 ocorrer ao longo do tempo como resultado da temperatura, mudança ou força mecânica,
113 nos quais componentes plásticos como monômeros, aditivos, corantes, tintas de
114 impressão, vernizes e outros componentes podem afetar as propriedades organolépticas
115 de alimentos, produzindo efeitos nocivos se seus níveis excederem os valores
116 toxicológicos determinados por legislação específica (Fasano et al., 2012; Paz Oliveira
117 et al., 2017). Também há dados mostrando que a exposição ao BPA mesmo em
118 concentrações inferiores ao determinado pela *Food and Drug Administração* (FDA) são
119 capazes de causar danos à vida dos organismos (Podein et al., 2010; Bernardo et al.,
120 2015).

121 Existem vários relatos demonstrando que o BPA é capaz de modificar a estrutura
122 do DNA de adultos e modular a expressão gênica, induzindo carcinogênese, ou
123 interferindo na ligação de receptores celulares em eventos pós-receptor. Além disso, o
124 BPA pode alterar a ação do sistema endócrino em glândulas como tireoide, hipotálamo
125 e hipófise, bem como atuar em certos processos reprodutivos (Atkinson e Roy, 1995;
126 Fasano et al., 2012; Bernardo et al., 2015; Paz Oliveira et al., 2017).

127 Como a reprodução está sujeita a regulação endócrina complexa, os efeitos de
128 disruptores podem afetar severamente os processos reprodutivos. Nos machos, a
129 exposição ao BPA causa espermatogênese disfuncional, aumento do número de células

130 apoptóticas nos túbulos seminíferos, variações nos níveis de hormônios e enzimas
131 esteroideogênicas, contagens de espermatozoides reduzidas e redução da motilidade
132 espermática; além de danos ao DNA do espermatozoide (Peretz et al., 2014). Nas
133 fêmeas, a exposição materna ao BPA durante a gestação causa início precoce de
134 puberdade, alterações no ganho de peso, abertura vaginal precoce, anormalidades
135 morfológicas ovarianas (Honma et al., 2002) e perda de folículo primordial na prole
136 (Manikkam et al., 2013). O mecanismo de ação mais conhecido do BPA é sua
137 capacidade de agir em ambos os receptores de estrogênio alfa e beta, provocando efeitos
138 genômicos e não genômicos. (Balakrishnan et al., 2010; Blumberg et al., 2011). A
139 avaliação correta da toxicidade para a saúde dos compostos depende de estudos (*in vitro*
140 e *in vivo*) capazes de representar com precisão o suposto efeitos causados por eles.

141 Dentro dos humanos, o BPA é adsorvido pelo trato gastrointestinal,
142 metabolizado no fígado e finalmente excretado pela urina (Giulivo et al., 2016). Em um
143 estudo de concepção avaliando homens e mulheres que procuram avaliação de
144 fertilidade, altos níveis de BPA urinário foram associados a uma probabilidade reduzida
145 de implantação, gravidez clínica e nascidos vivos, bem como uma diminuição na
146 contagem de folículos antrais (Messerlian et al., 2018). Sua difusão ficou evidente em
147 pesquisas nos Estados Unidos, realizadas pela *National Health and Nutrition*
148 *Examination Survey* (NHANES), na qual o BPA foi detectado na urina de 92% dos
149 participantes do estudo (Pelch et al., 2019).

150 O BPA é considerado um poluente ambiental, uma vez que resíduos podem ser
151 encontrados no meio ambiente em diferentes níveis devido à forma como são
152 eliminados e, portanto, o BPA pode atingir o solo e a água (Bernardo et al., 2015; Paz
153 Oliveira et al., 2017).

154 Portanto, existe a necessidade de melhor entender os efeitos de diferentes
155 concentrações de BPA em humanos e identificar seu mecanismo de ação avaliando a
156 toxicidade de BPA.

157

158 **MATERIAIS E MÉTODOS**

159

160 A análise de estudos pretéritos é condição básica para o desenvolvimento de
161 uma reflexão científica confiável. O método apresentado refere-se a uma revisão
162 integrativa (RI). A prática fundamentada em evidências, como facilitador da tomada de
163 decisão, pode ser conceituada como uma abordagem que envolve a definição de um
164 problema, busca, avaliação crítica e aplicação de evidências científicas disponíveis,
165 implementação das evidências na prática e avaliação dos resultados obtidos, sendo a
166 revisão integrativa um de seus recursos. Dentre os métodos de revisão da literatura, a
167 integrativa é o mais amplo, permitindo a combinação de dados de literatura teórica e
168 empírica para uma compreensão completa do fenômeno analisado. Para esta revisão
169 utilizou-se o referencial de Whitemore e Knafl (2005) que é um método rigoroso para a
170 realização de revisões integrativas, permitindo a síntese de estudos experimentais e não
171 experimentais para uma compreensão abrangente de fenômenos, principalmente na
172 saúde. Ele estrutura a revisão em 5 etapas principais: identificação do problema, busca
173 na literatura, avaliação dos dados, análise e apresentação.

174

175 **2.1 Identificação do Problema**

176 A presente investigação é uma revisão integrativa que teve como objetivo
177 sistematizar o conhecimento produzido acerca da capacidade do Bisfenol A ser nocivo

178 ao sistema endócrino, podendo afetar significativamente a fisiologia reprodutiva e
179 consequentemente interferir no desenvolvimento embrionário.

180

181 2.2 Busca em literatura

182 Os dados e artigos utilizados na revisão integrativa foram obtidos durante os
183 meses de maio a setembro de 2023. As buscas foram realizadas na base de dados
184 eletrônica *Pub Med*, disponível na internet, visto que é uma base de dados de extrema
185 credibilidade. Para as buscas, foram utilizadas as palavras chave no idioma inglês:
186 “bisfenol A”, “embrião”, “reprodução”, descritores controlados para este assunto com o
187 comando de busca “*and*”. Foram analisados os resultados dos últimos vinte anos (2003-
188 2023). Os 472 artigos listados na busca foram avaliados por três pessoas que realizaram
189 a exclusão de trabalhos que não atendiam a problemática proposta.

190

191 2.3 Avaliação dos dados

192 Os 472 trabalhos que continham as palavras chave selecionados foram
193 analisados individualmente, através da leitura do título e resumo. Registros duplicados e
194 trabalhos que não estavam relacionados aos objetivos propostos foram individualmente
195 excluídos. Ensaio clínico em outras espécies, estudos-piloto, artigos de revisão e
196 trabalhos que não abordaram o objetivo desta revisão foram excluídos, restando 46.

197 Foram selecionados trabalhos realizados *in vivo*, *in vitro* (1); em que houve
198 exposição ao BPA (2); estudando alterações na expressão gênica e embriotoxicidade
199 (3), restando 6 trabalhos que atendiam a estes critérios.

200

201 2.4 Análise

202 Na etapa de extração dos dados ocorreu a definição das informações a serem
203 extraídas dos estudos selecionados/categorização dos estudos, ou seja, a coleta de dados.
204 Para extração dos dados foi elaborada uma tabela com as seguintes informações de cada
205 estudo: autor (es) / ano de publicação, título do artigo, palavras-chave, objetivo e síntese
206 das conclusões.

207 2.5 Apresentação dos dados

208 Os dados obtidos dos artigos selecionados estão apresentados na tabela 1. Na
209 tabela 2 estão os autores, ano de publicação e palavras-chave dos artigos utilizados.

210

211 **RESULTADOS**

212 A pesquisa foi realizada na base de dados *Pub Med*. Ao todo foram encontrados
213 472 artigos completos, resumos, artigos de revisão ou capítulos de livros que traziam as
214 palavras-chave utilizadas na pesquisa bibliográfica. Destes, após triagem de títulos e
215 resumos por três avaliadores, 46 foram potencialmente escolhidos para avaliação
216 posterior, que preconizou trabalhos realizados *in vivo* e *in vitro* que expuseram embriões
217 ao BPA correlacionando alterações na expressão gênica e embriotoxicidade. Após
218 avaliação completa dos trabalhos, seis estudos experimentais preencheram os critérios
219 de inclusão (Figura 1). Quanto aos países dos artigos selecionados, dois tem como
220 origem a China, dois a Espanha, um a França e um o Japão. As extrações das
221 informações de interesse dos artigos selecionados estão detalhadas na tabela 1, quanto
222 aos anos de publicação foram: 2011 (1 publicação), 2018 (3 publicações), 2020 (1
223 publicação) e 2022 (1 publicação).

224 Caracterizando os resultados po eixos temáticos, revelou-se que:

225 1. Embriotoxicidade

226 Os estudos apontam que a exposição ao BPA compromete o desenvolvimento
227 embrionário desde as fases iniciais, reduzindo taxas de clivagem e formação de
228 blastocistos. Há prejuízo na competência embrionária, com alterações morfológicas,
229 aumento de apoptose e menor viabilidade dos embriões, evidenciam-se danos à função
230 mitocondrial embrionária e aumento do estresse oxidativo, impactando diretamente a
231 qualidade do desenvolvimento pré-implantacional. A toxicidade apresenta caráter dose-
232 dependente, inclusive em concentrações ambientalmente relevantes.

233 As alterações oxidativas metabólicas e moleculares observadas sugerem impacto
234 oxidativo relevante, incluindo perturbações metabólicas associadas à toxicidade celular,
235 ativação de vias relacionadas à apoptose, disfunções mitocondriais e alterações em vias
236 metabólicas energéticas e alterações no equilíbrio celular que podem comprometer o
237 desenvolvimento embrionário.

238 2. Efeitos Gonadais

239 Em fêmeas houve redução da qualidade e competência dos oócitos, alterações na
240 maturação meiótica e desorganização do fuso meiótico, aumento do estresse oxidativo
241 em oócitos e células da granulosa e maior atresia folicular, além de disfunção da
242 esteroidogênese ovariana, com redução de estradiol e progesterona.

243 Em machos os resultados apresentados evidenciam, prejuízo da
244 espermatogênese, alterações na morfologia espermática e redução da qualidade seminal,
245 disfunção das células de *Sertoli* e *Leydig*, com redução dos níveis de testosterona e
246 aumento de apoptose testicular.

247 Os desreguladores endócrinos como o BPA interferem diretamente no sistema
248 hormonal. Os estudos selecionados evidenciam que o BPA interfere diretamente no
249 sistema hormonal atuando na desregulação endócrina associada à atividade estrogênica

250 do BPA, alterando a expressão de genes regulados por hormônios, desestabilizando a
251 sinalização hormonal ligada à reprodução e ao desenvolvimento e alterando a regulação
252 epigenética mediada por hormônios durante a embriogênese.

253 3. Vias Moleculares

254 Atuação do BPA como desregulador endócrino com atividade estrogênica.
255 Alterações decorrentes de exposição ao BPA: ligação a receptores hormonais,
256 especialmente receptores estrogênicos, alterando a sinalização endócrina, indução de
257 estresse oxidativo por aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunção
258 mitocondrial em gametas e embriões, alterações na expressão gênica relacionadas à
259 reprodução, apoptose e desenvolvimento embrionário, modulação de vias apoptóticas
260 (BAX, BCL-2 e caspases) e alterações epigenéticas como metilação do DNA.

261 4. Transgeracionalidade

262 Nos estudos apresentados, o efeito transgeracional refere-se à manifestação de
263 alterações biológicas (reprodutivas, metabólicas ou embrionárias) em gerações
264 descendentes (como F1, F2 e F3) decorrentes da exposição ao BPA em uma geração
265 ancestral, mesmo na ausência de exposição direta nas gerações subsequentes, indicando
266 que os efeitos podem ser herdados biologicamente. Esse fenômeno está frequentemente
267 associado a mecanismos epigenéticos que modificam a regulação gênica sem alterar a
268 sequência do DNA.

269 Evidências indicam efeitos transgeracionais após exposição ao BPA, afetando
270 gerações F1, F2 e F3; alterações epigenéticas herdáveis, incluindo metilação do DNA e
271 modificações de histonas; comprometimento da fertilidade e da função gonadal em
272 descendentes não diretamente expostos; persistência de alterações na qualidade dos

273 gametas e no desenvolvimento embrionário nas gerações subsequentes; possível
274 programação fetal com impacto duradouro na saúde reprodutiva.

275

276 **DISCUSSÃO**

277 Os achados desta revisão evidenciam que a exposição ao bisfenol A em modelos
278 experimentais promove efeitos reprodutivos amplos e inter-relacionados, envolvendo
279 desde alterações precoces no desenvolvimento embrionário até comprometimentos
280 gonadais e modificações moleculares persistentes. Observou-se que a embriotoxicidade
281 ocorre de forma dose-dependente, inclusive em concentrações ambientalmente
282 relevantes, com redução das taxas de clivagem e viabilidade embrionária, aumento de
283 apoptose e prejuízo da função mitocondrial associado ao estresse oxidativo.
284 Paralelamente, foram descritas disfunções gonadais em ambos os sexos, incluindo
285 prejuízos na maturação oocitária, alterações na esteroidogênese ovariana e
286 comprometimento da espermatogênese, acompanhados por alterações hormonais
287 significativas. No nível mecanístico, os estudos convergem ao demonstrar que o BPA
288 atua como desregulador endócrino com atividade estrogênica, modulando receptores
289 hormonais, vias apoptóticas e processos epigenéticos, o que pode explicar a persistência
290 de efeitos transgeracionais observados até a geração F3. Em conjunto, esses resultados
291 reforçam que a toxicidade do BPA não se restringe a efeitos agudos, mas envolve
292 reprogramação molecular com repercussões duradouras sobre a saúde reprodutiva.

293 O BPA tem sido associado a vários distúrbios reprodutivos, incluindo falhas
294 hormonais, ciclo estral e distúrbios menstruais, aborto, alterações na maturação do
295 oócito e decréscimos na porcentagem de oócitos fertilizados (Machtinger e Orvieto,

296 2014; Moore-Ambriz et al., 2015). No ovário de mamíferos, os oócitos se desenvolvem
297 em um microambiente controlado dentro de unidades especializadas denominadas
298 folículos primordiais, primários, antrais e pré-ovulatórios. Dentro desta jornada de
299 desenvolvimento, os oócitos são comunicados bidirecionalmente com células
300 multicamadas do cumulus através de projeções citoplasmáticas; isso é conhecido como
301 lacuna comunicação intercelular juncional (GJIC), e resulta em um complexo cumulus
302 oócito (COC) (Li e Albertini, 2013). O GJIC no COC permite a passagem de íons,
303 metabólitos, moléculas sinalizadoras e segundos mensageiros das células do cumulus
304 para oócito para cumprir funções vitais, incluindo a manutenção da parada meiótica na
305 prófase I até que o oócito seja recrutado para a ovulação (Prasad et al., 2015). No
306 momento da ovulação, a fase luteinizante (meio do ciclo) aumenta o hormônio (LH)
307 atuando nos folículos pré-ovulatórios para que as células do cumulus possam expandir e
308 o oócito saia da prófase I e atinja a metáfase II (MII). A saída da prófase I é conhecida
309 como retomada meiótica, e esse processo é morfológicamente caracterizada como a
310 quebra da vesícula germinativa (Fulka et al., 1998; Shuhaibar et al., 2015). A expansão
311 das células do cumulus e a ocorrência de retomada meiótica são alcançados
312 principalmente pela ativação do LH-dependente da rede do fator de crescimento
313 epidérmico (Park et al., 2004), que ativa mecanismos que levam ao fechamento de GJIC
314 em COCs (Fulka et al., 1998; Shuhaibar et al., 2015). A interrupção de GJIC no COC
315 antes do estímulo de LH resulta em transição prematura da prófase I para MII (Isobe et
316 al., 1998).

317 Estudos têm demonstraram que o BPA tem como alvo o GJIC em vários
318 sistemas *in vivo* e *in vitro* (Salian et al., 2009), células epiteliais de ratos (Lee e Rhee,
319 2007), oócitos (Oh, 2015) e COCs de folículos de camundongos não iniciados (Campen

320 et al., 2017). O BPA também foi relatado para interromper a transição da prófase I para
321 MII em oócitos (Machtinger et al., 2013; Nakano et al., 2016), e este efeito adverso está
322 principalmente relacionado à organização interrompida de microtúbulos (Can et al.,
323 2005; Nakano et al., 2016). O BPA também induz uma uploidia em oócitos em
324 maturação (Hunt et al., 2003). Portanto, a reprodução feminina, especialmente o
325 desenvolvimento folicular ovariano, é interrompida pelo BPA. (Zhu et al., 2018). O
326 panorama de informações exposto neste estudo corrobora com os descritos em
327 literatura, visto que o BPA é um tóxico ovariano que atua através de várias vias
328 incluindo apoptose, estresse oxidativo e folicogênese (Ziv-Gal et al., 2016) resultando
329 na perda folicular, menos folículos antrais (Souter et al., 2013), reduzindo a sobrevivência
330 do oócitos (Briño-Enriquez et al., 2011) e perda de folículos primordiais (Manikkam et
331 al., 2013). Além disso, estudos realizados em animais revelaram o impacto negativo do
332 BPA no citoesqueleto do oócito, na indução do estresse oxidativo, no aumento do dano
333 ao DNA e na alteração do status das modificações epigenéticas no oócito (Ding et al.,
334 2017; Matuszczak et al., 2019).

335 Em uma variedade de espécies, a exposição ao BPA tem sido associada ao
336 aumento do estresse oxidativo, deficiência na maturação do oócito e alteração de peso
337 de órgãos. (Herrero et al., 2018). Evidências crescentes apontam que o BPA tem efeitos
338 prejudiciais significativos na saúde de humanos e animais (Pelch et al., 2019) que
339 provocou algumas restrições relacionadas ao seu uso; que ainda assim, permanece
340 altamente prevalente. O BPA é considerado um desregulador endócrino devido a
341 semelhança de sua molécula com o hormônio estradiol, resultando na capacidade de
342 comprometer o sistema endócrino. De fato, o BPA pode imitar hormônios através de
343 sua ligação aos receptores de estrogênio (ER), embora apenas a exposição a altas doses

344 possa afetar as funções de ligantes ER naturais, como estrogênios (Gould et al., 1998).
345 Estudos demonstram que o BPA afeta vários aspectos do sistema reprodutivo em
346 homens e mulheres, incluindo o desenvolvimento e a função das células germinativas
347 (Peretz et al., 2014). Nas mulheres, a exposição materna a doses ambientalmente
348 relevantes de BPA pode interromper precocemente o desenvolvimento do folículo
349 ovariano (Hunt et al., 2012) e promover o aumento das taxas de anormalidades
350 meióticas do oócito, incluindo aneuploidia (Hunt et al., 2003; Pacchierotti et al., 2008).
351 Anormalidades meióticas em oócitos também são evidentes, em oócitos desenvolvidos
352 em cultura ovariana *in vitro* com exposição contínua ao BPA (Lenie et al., 2008).

353 Os experimentos *in vitro* demonstraram alterações na retomada e na conclusão
354 da primeira divisão meiótica. Isso resulta na produção de óvulos cromossomicamente
355 anormais, uma vez que o desenvolvimento dos cromossomos meióticos é interrompido
356 (Hunt et al., 2003; Can et al., 2005).

357 O bisfenol A atua como desregulador endócrino e está presente principalmente
358 na composição de policarbonatos e resinas epóxi, o que permite que atinja não apenas o
359 ambiente doméstico, mas também a água (Huang et al., 2010); afetando muitos outros
360 processos fisiológicos (Moriyama et al., 2002). O BPA pode afetar significativamente a
361 fisiologia reprodutiva (Machtinger et al., 2014); já que a exposição a baixas doses de
362 BPA durante o desenvolvimento pré-natal e neonatal tem sido associada a uma ampla
363 variedade de efeitos, incluindo alterações na diferenciação sexual do cérebro, trato
364 reprodutivo masculino e feminino defeitos, complicações na gravidez e anormalidades
365 meióticas em oócitos fetais (Žalmanová et al., 2016). Tanto a foliculogênese quanto a
366 maturação oocitária (anormalidades meióticas) são afetadas pelo BPA (Ferris et
367 al., 2015). Em ratas expostas ao BPA durante dez dias houve atraso no início da

368 puberdade e na ciclicidade do estro (Ahsan et al., 2018). A detecção de BPA em
369 bovinos e o fluido folicular do oócito humano potencialmente os implica em efeitos
370 prejudiciais observados durante a maturação do oócito e desenvolvimento do embrião
371 (Cao et al., 2018). O BPA possui ação na foliculogênese, ovogênese, maturação do
372 oócito, fertilização, clivagem zigótica, degradação materna, transcrição, implantação e
373 outros eventos que envolvem diferenciação na expressão de micro RNAs únicos
374 (Gilchrist et al., 2016). Esses eventos são particularmente vulneráveis à perturbação por
375 fatores ambientais devido à sua alta natureza complexa e interconectada.

376

377 **CONCLUSÕES**

378 Este estudo sistematizou as evidências disponíveis acerca dos efeitos tóxicos do
379 bisfenol A sobre a fisiologia reprodutiva e o desenvolvimento embrionário,
380 demonstrando de forma consistente que a exposição parental ao composto está
381 associada a repercussões transgeracionais. Os dados analisados indicam que o BPA
382 exerce efeitos reprodutivos multifatoriais, envolvendo embriotoxicidade, disfunções
383 gonadais, alterações na esteroidogênese e modulações em vias hormonais, oxidativas,
384 apoptóticas e epigenéticas. Tais alterações sustentam seu papel como desregulador
385 endócrino capaz de comprometer a competência oocitária, a qualidade embrionária e a
386 homeostase reprodutiva, com potenciais impactos persistentes nas gerações
387 subsequentes. Embora os achados reforcem a relevância biológica e toxicológica do
388 BPA, ainda são necessários estudos adicionais, especialmente em modelos
389 translacionais e humanos, para elucidar de forma mais precisa os mecanismos
390 epigenéticos envolvidos e suas implicações para a saúde reprodutiva ao longo do ciclo
391 de vida.

392

393 Agradecimentos

394 A Capes, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

AHSAN, N. et al. Comparative effects of Bisphenol S and Bisphenol A on the development of female reproductive system in rats; a neonatal exposure study. **Chemosphere**, v. 197, p. 336–343, abr. 2018.

AKHTER, A. et al. Next-generation and further transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues. **Heliyon**, v. 4, n. 9, p. e00788, 15 set. 2018.

ALAVIAN-GHAVANINI, A.; RÜEGG, J. Understanding Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals: From Mechanisms to Novel Test Methods. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 122, n. 1, p. 38–45, 14 set. 2017.

ATKINSON, A.; ROY, D. In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 60–6, 1995.

BALAKRISHNAN, B. et al. Transfer of bisphenol A across the human placenta. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 202, n. 4, p. 393.e1-7, 1 abr. 2010.

BERNARDO, P. E. M. Bisphenol A: review on its use in the food packaging, exposure and toxicity. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 1, p. 1-11, 2015.

BLUMBERG, B.; IGUCHI, T.; ODERMATT, A. Endocrine disrupting chemicals. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1-2, p. 1–3, out. 2011.

BRIEÑO-ENRÍQUEZ, M. A. Human meiotic progression and recombination are affected by Bisphenol A exposure during in vitro human oocyte development. **Human Reproduction**, v. 26, n. 10, p. 2807-2818, 2011.

CAMPEN, K. A.; MCNATTY, K. P.; PITMAN, J. L. A protective role of cumulus cells after short-term exposure of rat cumulus cell-oocyte complexes to lifestyle or environmental contaminants. **Reprod Toxicol**, v. 69, p. 19-33, 2017.

CAN, A.; SEMIZ, O.; CINAR, O. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. **Mol Hum Reprod**, v. 11, n. 6, p. 389-396, 2005.

CAO, Y. et al. The correlation between exposure to BPA and the decrease of the ovarian reserve. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 11, n. 7, p. 3375-3382, jul. 2018.

DING, Z. M. et al. Bisphenol AF negatively affects oocyte maturation of mouse in vitro through increasing oxidative stress and DNA damage. **Chemico-Biological Interactions**, v. 278, p. 222–229, 2017.

DODDS, E. C.; LAWSON, W. Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. **Nature**, v. 137, n. 3476, p. 996–996, jun. 1936.

DONG, X. et al. Proteomic profile and toxicity pathway analysis in zebrafish embryos exposed to bisphenol A and di-n-butyl phthalate at environmentally relevant levels. **Chemosphere**, v. 193, p. 313–320, fev. 2018.

FASANO, E. et al. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di (2-ethylhexyl) adipate from food packaging. **Food Control**, v. 27, n. 1, p. 132-138, 2012.

FERRIS, J.; FAVETTA, L. A.; KING, W. A. Bisphenol A Exposure during Oocyte Maturation in vitro Results in Spindle Abnormalities and Chromosome Misalignment in *Bos taurus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 145, n. 1, p. 50–58, 2015.

- FULKA, J. JR.; FIRST, N. L.; MOOR, R. M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Mol Hum Reprod**, v. 4, n. 1, p. 41-49, 1998.
- GIBERT, Y. et al. Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis. **BMC Developmental Biology**, v. 11, n. 1, 26 jan. 2011.
- GILCHRIST, G. et al. MicroRNA Expression during Bovine Oocyte Maturation and Fertilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 396-396, 18 mar. 2016.
- GIULIVO, M. et al. Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. **Environ Res**, v.151, p. 251-264, 2016.
- GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 4, p. 323-330, ago. 2000.
- GONÇALVES, P. et al. Evaluation of the Toxicity of Bisphenol A in Reproduction and Its Effect on Fertility and Embryonic Development in the Zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 2, p. 962-962, 15 jan. 2022.
- GORE, A.C. EDC-2: the endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. **Endocr Rev**, v. 36, n.6, 2015.
- GOULD, J. C. et al. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 142, n. 1-2, p. 203-214, jul. 1998.
- HERRERO, Ó. et al. The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0193387, 21 fev. 2018.
- HONMA, S. et al. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. **Reprod Toxicol**, v. 16, n. 2, p. 117-122, 2002.
- HUANG, S.; HANG, Y. Simultaneous determination of bisphenol A and tetrabromobisphenol A in plastic products using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Chinese Journal of Chromatography**, v. 28, p. 863-866, 2010.
- HUANG, W. et al. A transcriptomics-based analysis of toxicity mechanisms of zebrafish embryos and larvae following parental Bisphenol A exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 205, p. 111165, dez. 2020.
- HUNT, P. A. et al. Bisphenol A alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of the rhesus monkey. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 109, p. 17525-17530, 2012.
- HUNT, P. A. et al. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. **Current Biology**, v. 13, p. 546-553, 2003.
- ISOBE, N.; MAEDA, T.; TERADA, T. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes. **J Reprod Fertil**, v. 113, n. 2, p. 167-172, 1998.
- JALAL, N. et al. Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 76-84, 2018.
- KUSVURAN, E.; YILDIRIM, D. Degradation of bisphenol A by ozonation and determination of degradation intermediates by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. **Chemical Engineering Journal**, v. 220, p. 6-14, mar. 2013.
- LEE, I.K.; RHEE, S. K. Inhibitory effect of bisphenol A on gap junctional intercellular communication in an epithelial cell line of rat mammary tissue. **Arch Pharm Res**, v. 30, n. 3, p. 337-343, 2007.

- LENIE, S. Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. **Mutation Research**, v. 651, p. 71–81, 2008.
- LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 141–152, mar. 2013.
- MACHTINGER, R. et al. Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. **Human Reproduction**, v. 28, p. 2735–2745, 2013.
- MACHTINGER, R.; ORVIETO, R. Bisphenol A, oocyte maturation, implantation, and IVF outcome: review of animal and human data. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 29, n. 4, p. 404–410, out. 2014.
- MANIKKAM, M. et al. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. **PloS One**, v. 8, n. 1, p. 55387, 2013.
- MATUSZCZAK, E. et al. The Impact of Bisphenol A on Fertility, Reproductive System, and Development: A Review of the Literature. **International Journal of Endocrinology**, v. 2019, p. 1–8, 10 abr. 2019.
- MESSERLIAN, C. et al. The Environment and Reproductive Health (EARTH) Study: a prospective preconception cohort. **Human Reproduction Open**, v. 2018, n. 2, 2018.
- MOORE-AMBRIZ, T. R. et al. Exposure to bisphenol A in young adult mice does not alter ovulation but does alter the fertilization ability of oocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 507–514, dez. 2015.
- MORIYAMA, K. et al. Thyroid Hormone Action Is Disrupted by Bisphenol A as an Antagonist. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 11, p. 5185–5190, nov. 2002.
- NAKANO, K. et al. Comparison of the effects of BPA and BPAF on oocyte spindle assembly and polar body release in mice. **Zygote**, v. 24, n. 2, p. 172–180, 30 abr. 2015.
- OH, S. Bisphenol A and 4-tert-Octylphenol Inhibit Cx46 Hemichannel Currents. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 73, 2015.
- ORTIZ-VILLANUEVA, E. et al. Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis. **Science of The Total Environment**, v. 635, p. 156–166, set. 2018.
- PACCHIEROTTI, F. et al. Evaluation of aneugenic effects of bisphenol A in somatic and germ cells of the mouse. **Mutation Research**, v. 12, n. 651, p. 64-70, mar. 2008.
- PARK, J. Y. et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682-684, 2004.
- PAZ OLIVEIRA, G. D. C. et al. Bisfenol A: possíveis efeitos e danos ao organismo - revisão de literatura. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 2, n. 2, p. 11-16, 2017.
- PELCH, K. et al. A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. **Toxicology**, v. 1, n. 424, p. 152235, jun. 2019.
- PERETZ, J. et al. Bisphenol A and Reproductive Health: Update of Experimental and Human Evidence, 2007–2013. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 8, p. 775–786, ago. 2014.
- PODEIN, R. J. et al. Sustainability, Synthetic Chemicals, and Human Exposure. **EXPLORE**, v. 6, n. 3, p. 186–188, maio 2010.

PRASAD, S. et al. Changes in signal molecules and maturation promoting factor levels associate with spontaneous resumption of meiosis in rat oocytes. **Cell biology international**, v. 39, n. 6, p. 759–769, 29 jan. 2015.

SALIAN, S.; DOSHI, T.; VANAGE, G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. **Toxicology**, v. 265, n. 1-2, p. 56–67, nov. 2009.

SCOPEL, C. F. V. et al. BPA toxicity during development of zebrafish embryo. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2, 2020.

SHUHAIBAR, L. C. et al. Intercellular signaling via cyclic GMP diffusion through gap junctions restarts meiosis in mouse ovarian follicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 17, p. 5527–5532, 16 mar. 2015.

SODRÉ, F. F. et al. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 187–196, 2007.

SOUTER, I. et al. The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments. **Reproductive Toxicology**, v. 42, p. 224–231, dez. 2013.

WHITTEMORE, R.; KNAFL, K. The integrative review: Updated methodology. **Journal of Advanced Nursing**, v. 52, n. 5, p. 546–553, dez. 2005.

ŽALMANOVÁ, T. et al. Bisphenol S instead of bisphenol A: a story of reproductive disruption by regrettable substitution – a review. **Czech Journal of Animal Science**, v. 61, n. No. 10, p. 433–449, 24 out. 2016.

ZHU, X. et al. Effects of bisphenol A on ovarian follicular development and female germline stem cells. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 4, p. 1581–1591, 29 jan. 2018.

ZIV-GAL, A.; FLAWS, J. A. Evidence for bisphenol A-induced female infertility - Review (2007–2016). **Fertility and sterility**, v. 106, n. 4, p. 827–856, 15 set. 2016.

FIGURAS

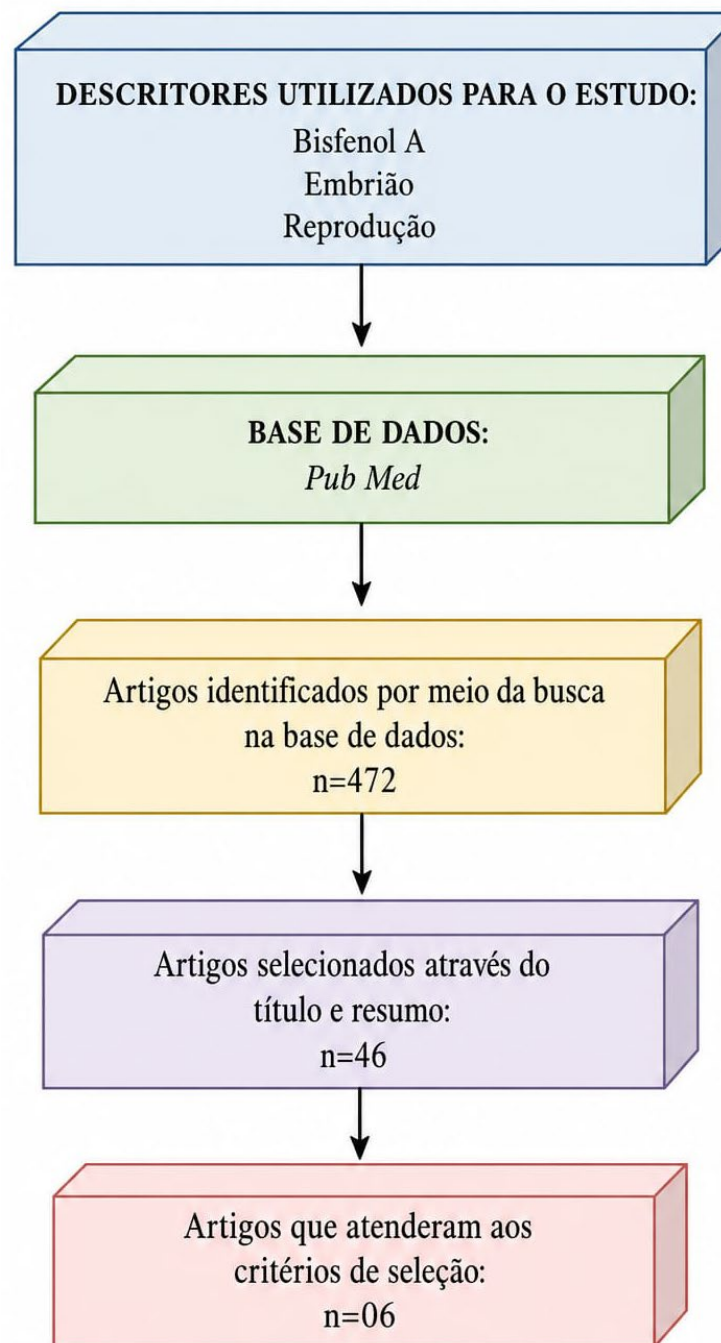


Figura1: Fluxograma da seleção dos artigos para a revisão integrativa. Fonte: Dados da pesquisa.

TABELAS

Tabela 1: Informações de interesse dos artigos selecionados para a revisão integrativa. Fonte: Dados da pesquisa

ESTUDO	MODELO EXPERIMENTAL	ALVO BIOLÓGICO	PRINCIPAIS ACHADOS	EIXO TEMÁTICO PREDOMINANTE
Estudos com embriões (zebrafish e mamíferos)	<i>In vitro e in vivo</i>	Embriões	Redução do desenvolvimento embrionário, aumento de apoptose e alterações morfológicas	Embriotoxicidade
Estudos com oócitos	<i>In vitro</i> (maturação oocitária)	Oócitos e células da granulosa	Redução da competência meiótica, aumento do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial	Efeitos gonadais / Vias moleculares
Estudos endócrinos reprodutivos	Modelos animais	Ovário e testículo	Desregulação hormonal, prejuízo da esteroidogênese e da foliculogênese	Efeitos gonadais
Estudos de estresse oxidativo	<i>In vitro e in vivo</i>	Gametas e embriões	Aumento de ROS, dano mitocondrial e ativação de vias apoptóticas	Vias moleculares
Estudos epigenéticos	Modelos multigeracionais	Gametas e descendentes	Alterações na metilação do DNA e expressão gênica herdável	Transgeracionalidade
Estudos transgeracionais (F1, F2 e F3)	Modelos animais multigeracionais	Sistema reprodutivo da prole	Redução da fertilidade e alterações gonadais em gerações não diretamente expostas	Transgeracionalidade

Tabela 2. Informações de autores, título e palavras-chave dos artigos utilizados para a revisão integrativa. Fonte: Dados da pesquisa

AUTOR/ANO	TÍTULO	PALAVRAS-CHAVE
Yann Gibert, Sana Sassi-Messai, Jean-Baptiste Fini, Laure Bernard, Daniel Zalko, Jean-Pierre Cravedi, Patrick Balaguer, Monika Andersson-Lendahl, Barbara Demeneix, Vincent Laudet. 2011.	Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis.	-
Afroza Akhter, Mostafizur Rahaman, Ryu-to Suzuki, Yuki Muro, Toshinobu Tokumoto. 2018.	Next-generation and further transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues.	Developmental biology; Physiology; Zoology.
Elena Ortiz-Villanueva, Joaquim Jaumot, Rubén Martínez, Laia Navarro-Martín, Benjamin Piña, Romà Tauler. 2018.	Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (<i>Danio rerio</i>) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis.	Endocrine disrupting chemicals; Bisphenol A; Perfluorooctane sulfonate; Tributyltin; Untargeted metabolomics; Zebrafish embryos.
Xing Dong, Xuchun Qiu, Shunlong Meng, Hai Xu, Xiangyang Wu, Ming Yang. 2018	Proteomic profile and toxicity pathway analysis in zebrafish embryos exposed to bisphenol A and di-n-butyl phthalate at environmentally relevant levels.	Proteomics; Toxicity pathway; Endocrine-disrupting chemicals; Bisphenol A; Di-n-butyl phthalate; Zebrafish.
Wenlong Huang, Shukai Zheng, Xin Wang, Zemin Cai, Jiefeng Xiao, Caixia Liu, Kusheng Wu. 2020.	A transcriptomics-based analysis of toxicity mechanisms of zebrafish embryos and larvae following parental Bisphenol A exposure.	Bisphenol A; Toxicity pathways; Transcriptomics; Zebrafish; Embryos; Larvae.
Lilian de Paula Gonçalves Reis, Antonio Jesús Lora-Benítez, Ana M ^a Molina-López, Rafael Mora-Medina, Nahúm Ayala-Soldado and M ^a del Rosario Moyano-Salvago. 2022.	Evaluation of the Toxicity of Bisphenol A in Reproduction and Its Effect on Fertility and Embryonic Development in the Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).	Bisphenol A; zebrafish; fertility; embryotoxicity; endocrine-disrupting chemicals.

1 **ARTIGO CIENTÍFICO 2 – A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA**

2 ***ANIMAL REPRODUCTION***

3 **Bisphenol A exposure during in vitro maturation impairs oocyte competence and**
4 **embryo development in cattle**

5 Fernanda Luiza Guinossi Barbosa Deak¹(<https://orcid.org/0000-0002-7917-8770>), Sarah
6 Gomes Nunes²(<https://orcid.org/0000-0002-7957-1660>), Priscila Helena dos Santos³
7 (<https://orcid.org/0009-0005-2705-0571>), Fernanda Fagali Franchi^{2, 4}
8 (<https://orcid.org/0000-0002-9859-0576>), Anthony César de Souza Castilho¹
9 (<https://orcid.org/0000-0003-1666-7021>)

10 ¹ University of Western São Paulo (Unoeste), Department of Animal Science,
11 Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

12 ² São Paulo State University (Unesp), Department of Pharmacology, Institute of
13 Biosciences, Botucatu, São Paulo, Brazil.

14 ³ Department of Veterinary Medicine, Faculty of Animal Science and Food
15 Engineering, USP, Pirassununga, SP, Brazil.

16 ⁴ Reproductive and Developmental Biology Laboratory, Department of Veterinary
17 Medicine and Animal Science, University of Milan, Milan, Italy. University of Western
18 São Paulo (Unoeste), Department of Animal Science, Presidente Prudente, São Paulo,
19 Brazil.

20 *Correspondence: fernandadeak@gmail.com.

21

22 **ABSTRACT**

23 Bisphenol A (BPA) is a ubiquitous endocrine-disrupting chemical associated with
24 reproductive dysfunction in humans and animals. Due to continuous environmental

25 exposure and incomplete metabolic clearance, BPA accumulates in biological fluids,
26 including follicular fluid, where it may directly affect gamete competence. The present
27 study investigated the effects of BPA exposure during in vitro maturation (IVM) of
28 bovine oocytes on meiotic progression, oxidative status, mitochondrial function, and
29 subsequent embryonic development. Cumulus–oocyte complexes recovered from
30 abattoir-derived ovaries were matured in vitro in control medium or supplemented with
31 BPA (10, 50, 100, 500, or 1000 μ M). Oocytes exposed to 1000 μ M BPA were evaluated
32 for nuclear maturation, intracellular reactive oxygen species levels, and mitochondrial
33 membrane potential. After IVM, oocytes from all groups were subjected to in vitro
34 fertilization and culture to assess developmental competence. Exposure to 1000 μ M
35 BPA significantly reduced the proportion of oocytes reaching metaphase II and
36 increased oxidative stress. High BPA concentrations severely impaired embryo
37 development, leading to early developmental arrest. These findings demonstrate that
38 elevated BPA levels during oocyte maturation compromise meiotic competence and
39 embryonic viability, reinforcing the bovine model as a relevant translational platform
40 for studying BPA-induced reproductive toxicity.

41 **Keywords:** BPA, endocrine disruptor, oxidative stress, oocytes, embryo production.

42

43 INTRODUCTION

44

45 Synthetic polymers have become indispensable in contemporary society,
46 permeating domestic, industrial, agricultural, and biomedical contexts. Global plastic
47 production surpassed 400 million metric tons in 2022 and continues to rise steadily,
48 reflecting its extensive incorporation into food packaging, medical devices, electronics,

49 and livestock production systems (Hahladakis et al., 2022; Nayanathara and Ratnayake,
50 2024). Plastics are primarily composed of petrochemical-derived polymers combined
51 with diverse additives that confer durability, flexibility, and thermal stability. Among
52 these additives, bisphenol A (BPA) is one of the most extensively produced and studied
53 compounds due to its widespread industrial application in polycarbonate plastics and
54 epoxy resins (Hunt et al., 2009).

55 BPA is classified as an endocrine-disrupting chemical (EDC) owing to its
56 capacity to interfere with hormonal signaling pathways (Matuszczak et al., 2019).
57 Structurally analogous to estradiol, BPA exhibits weak estrogenic activity while also
58 exerting antiandrogenic and antithyroid effects, thereby perturbing multiple endocrine
59 axes (Welshons et al., 2006; vom Saal et al., 2007). Its lipophilic nature facilitates
60 passive diffusion across biological membranes, enabling systemic distribution and
61 interaction with nuclear and membrane-bound hormone receptors (Patel et al., 2015).
62 Although BPA undergoes hepatic conjugation and rapid clearance in adults, continuous
63 environmental exposure results in sustained internal dosing, with measurable levels
64 detected in urine, plasma, follicular fluid, amniotic fluid, and breast milk (Mok-Lin et
65 al., 2010a,b; Bloom et al., 2011; Ehrlich et al., 2012; Raimondo et al., 2024). These
66 findings underscore its pervasive bioavailability and potential to reach reproductive
67 tissues.

68 Accumulating clinical evidence implicates BPA exposure in compromised
69 female reproductive function. In women undergoing assisted reproductive technologies,
70 elevated urinary and serum BPA concentrations have been inversely associated with
71 oocyte yield and peak estradiol levels during controlled ovarian stimulation (Mok-Lin et
72 al., 2010a; Bloom et al., 2011). Higher BPA exposure has also been linked to reduced

73 proportions of metaphase II oocytes, impaired implantation, and decreased clinical
74 pregnancy rates in IVF and ICSI cycles (Fujimoto et al., 2011). Collectively, these data
75 suggest that environmentally relevant BPA concentrations may adversely affect
76 folliculogenesis, oocyte maturation, and early embryonic competence.

77 Experimental studies in rodent and bovine models further support these clinical
78 observations. BPA exposure disrupts meiotic progression, compromises spindle
79 assembly, alters chromosomal alignment, and increases aneuploidy rates, ultimately
80 impairing embryonic development (Wang et al., 2016; Acuña-Hernández et al., 2018;
81 Pan et al., 2021; Yao et al., 2023; Negrón-Pérez et al., 2025). Mechanistically, BPA-
82 induced reproductive toxicity has been associated with oxidative stress, mitochondrial
83 dysfunction, cytoskeletal disorganization, and dysregulation of apoptotic pathways
84 during oocyte maturation. Given the central role of mitochondrial activity and redox
85 homeostasis in supporting meiotic competence and cytoplasmic maturation, disruption
86 of these processes may critically compromise developmental potential.

87 Despite extensive literature describing BPA's endocrine-disrupting properties,
88 relatively few studies have systematically examined the effects of high-dose exposure
89 during oocyte maturation. Understanding dose-dependent responses is essential for
90 elucidating the cellular thresholds beyond which compensatory mechanisms fail and
91 irreversible damage occurs. Therefore, the present study employs the bovine in vitro
92 maturation model—an established translational platform for human reproductive
93 biology—to investigate the impact of elevated BPA concentrations on meiotic
94 progression, cellular homeostasis, and subsequent embryonic development. This
95 approach aims to refine our mechanistic understanding of BPA-induced reproductive
96 toxicity and its potential implications for female fertility.

97

98 METHODS

99 Unless otherwise mentioned, all products were purchased from Sigma-Aldrich
100 Co. (St. Louis, MO, USA) with high purity.

101

102 Experimental design

103 Bisphenol A (BPA) was prepared as previously described by Desmarchais et al.
104 (2020). A concentrated stock solution was dissolved in absolute ethanol and then diluted
105 in maturation medium to achieve final concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 μM .
106 The final ethanol concentration was standardized to 0.01% (v/v) in all experimental
107 groups. The control group was cultured in the same basal medium supplemented with
108 0.01% ethanol only, ensuring equivalent solvent exposure and eliminating vehicle-
109 related bias.

110 In Experiment 1, cumulus–oocyte complexes (COCs) underwent in vitro
111 maturation (IVM) in the presence of increasing BPA concentrations (0, 10, 50, 100,
112 500, or 1000 μM), and subsequent embryonic development rates were assessed
113 following in vitro fertilization and culture. In Experiment 2, a high BPA concentration
114 (1000 μM) was selected to further investigate its impact during IVM on oocyte
115 developmental competence and associated cellular parameters (Figure 1).

116

117 Cumulus-oocyte complex collection

118 Ovaries from *Bos taurus indicus* females were obtained at a commercial abattoir
119 (22°25'24"S, 48°09'21"W) immediately after slaughter and transported to the laboratory
120 in sterile 0.9% sodium chloride solution maintained at 36°C. Upon arrival, ovarian

121 follicles measuring 2–8 mm in diameter were aspirated using an 18-gauge needle
122 attached to a sterile syringe, and the follicular contents were collected into 15 mL
123 conical tubes.

124 After sedimentation of the follicular fluid, cumulus–oocyte complexes (COCs)
125 were recovered and morphologically evaluated under a stereomicroscope. Only COCs
126 with homogeneous cytoplasm and surrounded by a compact, multilayered cumulus
127 investment, classified as grades 1 or 2, were selected for subsequent experiments
128 according to the criteria described by Stojkovic et al. (2001).

129

130 **In vitro maturation**

131 Selected cumulus–oocyte complexes (COCs) were washed in a buffered
132 handling medium and randomly assigned to experimental groups according to the study
133 design. Each COC was cultured individually in a 10- μ L microdrop of in vitro
134 maturation (IVM) medium under mineral oil.

135 The basal IVM medium consisted of TCM-199 supplemented with bicarbonate
136 and Earle's salts, recombinant follicle-stimulating hormone (FSH; 0.1 IU/mL; Gonal-
137 f®, Merck Serono, Bari, Italy), sodium pyruvate (22 μ g/mL), amikacin (75 μ g/mL), and
138 fatty acid–free bovine serum albumin (BSA; 4 mg/mL). For the treatment groups,
139 bisphenol A (BPA) was added to the maturation medium to achieve the specified
140 experimental concentrations.

141

142 **In vitro fertilization and in vitro culture**

143 Following in vitro maturation, cumulus–oocyte complexes (COCs) were washed
144 three times in fertilization medium and transferred in groups of 25 into 90- μ L

145 microdrops of in vitro fertilization (IVF) medium under silicone oil (Botupharma®,
146 Botucatu, São Paulo, Brazil). The IVF medium consisted of Tyrode's albumin–lactate–
147 pyruvate (TALP) supplemented with bovine serum albumin (BSA; 6 mg/mL), sodium
148 pyruvate (22 µg/mL), amikacin (75 µg/mL), heparin (30 µg/mL), and a penicillamine–
149 hypotaurine–epinephrine (PHE) mixture (20 µM penicillamine, 10 µM hypotaurine, and
150 1 µM epinephrine).

151 Frozen–thawed semen from a single Nelore bull (CRV Lagoa, Sertãozinho, São
152 Paulo, Brazil) was thawed at 37 °C for 30 s. Motile spermatozoa were selected using a
153 discontinuous density gradient (45% and 90%) prepared with BotuFIV Select SPERM®
154 (Botupharma®, Brazil), followed by centrifugation at 3000 × g for 5 min (MiniSpin®,
155 Eppendorf, Hamburg, Germany). The supernatant was discarded, and the sperm pellet
156 was resuspended in IVF medium to a final concentration of 1×10^6 spermatozoa/mL. A
157 7-µL aliquot of sperm suspension was added to each fertilization drop, and gametes
158 were co-incubated for 18 h at 38.5 °C in a humidified atmosphere containing 5.5% CO₂
159 in air.

160 After fertilization, presumptive zygotes were mechanically denuded by
161 vortexing to remove residual cumulus cells and washed three times in Synthetic Oviduct
162 Fluid (SOF). Zygotes were then cultured in 500 µL of in vitro culture (IVC) medium
163 per well. The IVC medium consisted of SOF supplemented with amino acids (SOFaa),
164 fetal bovine serum (2.5%), BSA (5 mg/mL), sodium pyruvate (0.2 mM), and amikacin
165 (75 µg/mL).

166

167 **Assessment of nuclear maturation, mitochondrial function, and intracellular reactive**
168 **oxygen species in oocytes**

169 A combined fluorescence staining protocol using Hoechst 33342, MitoTracker®
170 Red CMXRos, and CellROX™ Green Reagent (Invitrogen, USA) was used to assess
171 nuclear maturation status, mitochondrial membrane potential (MMP; indirect indicator),
172 and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in oocytes.

173 After in vitro maturation, cumulus cells were removed by vortexing, and
174 denuded oocytes were washed in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2)
175 supplemented with 1 mg/mL polyvinylpyrrolidone (PBS-PVP). Oocytes were then
176 incubated for 30 min at 38.5 °C in a humidified atmosphere containing 5.5% CO₂ in air
177 with Hoechst 33342 (1 µg/mL) for chromatin visualization, CellROX™ Green (5 µM)
178 for ROS detection, and MitoTracker® Red CMXRos (0.5 µM) to evaluate MMP-
179 dependent mitochondrial activity.

180 After incubation, oocytes were washed three times in PBS-PVP and fixed in 4%
181 paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Fixed samples were washed again,
182 mounted in glycerol microdrops on glass slides, covered with coverslips, and examined
183 using a Leica DM4500 epifluorescence microscope (Leica Camera AG, Wetzlar,
184 Germany).

185 Fluorescence images were captured at 40× magnification using LAS software
186 with a digital imaging system. Nuclear maturation was classified based on chromatin
187 configuration, and fluorescence intensity corresponding to ROS and MMP was
188 quantified as mean pixel intensity using ImageJ software (National Institutes of Health,
189 Bethesda, MD, USA).

190

191 **Statistical analysis**

192 Maturation, degeneration, and blastocyst rates were expressed as percentages
193 and subjected to arcsine square-root transformation before statistical analysis to stabilize
194 variance. Assumptions of normality and homogeneity of variances were evaluated using
195 appropriate diagnostic tests. When necessary, logarithmic transformation was applied to
196 meet the requirements for parametric analysis. Data were analyzed by one-way analysis
197 of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test when more than
198 two groups were compared. For comparisons involving only two groups, an unpaired
199 Student's t-test was used for normally distributed data, while the Wilcoxon rank-sum
200 test was applied when normality assumptions were not met.

201 All statistical analyses were performed using JMP software (version 7.0; SAS
202 Institute Inc., Cary, NC, USA). Results are presented as mean \pm standard error of the
203 mean (SEM), and differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

204

205 **RESULTS**

206 A total of 553 oocytes were evaluated for embryonic development following in
207 vitro fertilization. The control group showed a cleavage rate of $78.5 \pm 3.2\%$. Exposure
208 to BPA at 10, 50, and 100 μM led to progressive, though moderate, reductions in
209 cleavage rates ($74.2 \pm 4.1\%$, $70.8 \pm 3.7\%$, and $69.8 \pm 2.9\%$, respectively). In contrast,
210 exposure to 500 or 1000 μM BPA completely abolished cleavage ($0.0 \pm 0.0\%$; $P <$
211 0.001). A similar pattern was observed for blastocyst development. Blastocyst rates in
212 the 10 μM ($57.22 \pm 9.83\%$) and 50 μM ($62.50 \pm 4.33\%$) groups were comparable to or
213 slightly higher than the control ($57.08 \pm 1.72\%$), while exposure to 100 μM BPA
214 reduced blastocyst formation ($46.94 \pm 0.28\%$; $P < 0.001$). No embryos were obtained
215 from oocytes exposed to 500 or 1000 μM BPA ($0 \pm 0\%$; Table 1).

216 To clarify the absence of embryonic development at the highest concentration,
217 oocytes matured in the presence of 1000 μ M BPA were evaluated after IVM. BPA
218 exposure significantly impaired nuclear maturation ($P = 0.037$). In the control group,
219 $81.38 \pm 1.76\%$ of oocytes reached metaphase II (MII), whereas none of the BPA-treated
220 oocytes progressed to MII ($0 \pm 0\%$). Degeneration rates were markedly increased in the
221 BPA group ($95.65 \pm 4.35\%$) compared with controls ($4.46 \pm 2.77\%$; $P = 0.004$), while
222 no differences were observed at the MI stage ($P = 0.919$; Table 2).

223 Fluorescence analyses showed that BPA exposure significantly increased
224 intracellular ROS levels and mitochondrial membrane potential (MMP) activity ($P <$
225 0.001 ; Figure 2). ROS intensity rose from 14.97 ± 0.86 a.u. in controls to 28.35 ± 1.37
226 a.u. in the BPA group. Similarly, MMP fluorescence increased from 29.70 ± 1.35 a.u. in
227 controls to 38.07 ± 1.20 a.u. following exposure to 1000 μ M BPA.

228

229 **DISCUSSION**

230 The bovine model provides a robust and translationally relevant system for
231 investigating reproductive toxicology, given its close physiological similarity to humans
232 in follicular dynamics, oocyte maturation, and endocrine regulation (Beker van
233 Woudenberg et al., 2012). Using bovine cumulus–oocyte complexes, this study
234 demonstrates that exposure to 1000 μ M BPA during in vitro maturation exerts a
235 pronounced cytotoxic effect. High-dose BPA significantly reduced the proportion of
236 oocytes reaching the metaphase II (MII) stage and substantially increased degeneration
237 rates, ultimately resulting in complete failure of embryonic development. The absence
238 of cleavage and blastocyst formation at 500 and 1000 μ M indicates that high-dose BPA

239 exerts profound cytotoxic and/or meiotic-disruptive effects that prevent the acquisition
240 of developmental competence.

241 BPA is a well-established endocrine-disrupting chemical frequently detected in
242 human biological fluids, including urine, breast milk, and follicular fluid, reflecting
243 continuous and widespread exposure (Welshons et al., 2006; Mok-Lin et al., 2010b;
244 Matuszczak et al., 2019; Raimondo et al., 2024). In this study, BPA impaired embryo
245 development in a concentration-dependent manner. While lower concentrations did not
246 compromise blastocyst formation, higher concentrations significantly reduced
247 developmental competence, culminating in complete developmental arrest. These
248 findings support a dose-dependent cytotoxic effect of BPA on the oocyte, impairing its
249 capacity to sustain fertilization and early embryogenesis.

250 Mechanistically, BPA has been shown to disrupt mitochondrial function, spindle
251 organization, and redox homeostasis following *in vivo* and *in vitro* exposure (Hunt et
252 al., 2003; Can et al., 2005; Ferris et al., 2015). Even transient exposure during oocyte
253 maturation appears sufficient to induce persistent cellular dysfunction. Disruption of
254 meiotic spindle assembly, chromosomal alignment, and polar body extrusion has been
255 consistently reported across species (Susiarjo and Hunt, 2008; Machtinger et al., 2013;
256 Nakano et al., 2016; Radwan et al., 2020). In agreement with these studies, exposure to
257 1000 μM BPA in this work resulted in complete inhibition of meiotic progression, as
258 evidenced by the absence of MII-stage oocytes and a dramatic increase in degeneration.
259 The preservation of MI-stage proportions suggests that BPA interferes with meiotic
260 completion rather than initial meiotic resumption, indicating a specific disruption of
261 processes required for transition to MII.

262 Oxidative stress appears to be a central mediator of these effects. Although
263 physiological levels of reactive oxygen species (ROS) participate in meiotic signaling,
264 excessive ROS accumulation promotes apoptosis, autophagy, and cellular senescence
265 (Kala et al., 2017). The significant increase in intracellular ROS observed following
266 BPA exposure, together with altered mitochondrial membrane potential, indicates
267 profound mitochondrial dysfunction. BPA has been associated with modulation of
268 autophagic and apoptotic pathways, potentially involving AMPK/mTOR signaling
269 (Zhang et al., 2004; Lambert and Brand, 2009; Lee et al., 2013). The elevated ROS and
270 mitochondrial alterations observed here are consistent with activation of these stress-
271 response pathways, which may culminate in early apoptotic or autophagic events,
272 thereby compromising oocyte viability and developmental competence.

273 Collectively, our data demonstrate a clear concentration-dependent impairment
274 of bovine in vitro embryo production following BPA exposure during oocyte
275 maturation. High-dose BPA induced marked oxidative imbalance and mitochondrial
276 dysfunction, which were accompanied by complete inhibition of meiotic progression
277 and total loss of embryonic developmental competence. These findings establish a
278 direct functional link between redox disruption, mitochondrial instability, and the
279 inability of oocytes to sustain fertilization and early embryogenesis. Also, the findings
280 highlight oocyte maturation as a particularly vulnerable developmental window, during
281 which disturbances in oxidative homeostasis and mitochondrial activity can irreversibly
282 compromise reproductive potential. Considering the widespread detection of BPA in
283 biological fluids and its established endocrine-disrupting properties, these findings
284 further substantiate concerns regarding its reproductive toxicity. The bovine model
285 employed herein offers a physiologically relevant translational platform to elucidate the

286 cellular basis of BPA-induced reproductive impairment and reinforces the need to limit
287 environmental exposure in order to safeguard female fertility.

288

289 **CONCLUSION**

290 The BPA exposure during in vitro maturation exerts severe cytotoxic effects on
291 bovine oocytes, characterized by complete meiotic arrest, increased degeneration,
292 elevated oxidative stress, and altered mitochondrial membrane potential. These cellular
293 disturbances culminate in total loss of cleavage and blastocyst formation, demonstrating
294 that disruption at the maturation stage irreversibly compromises developmental
295 competence. Together, these findings provide mechanistic evidence that mitochondrial
296 dysfunction and redox imbalance underlie BPA-induced reproductive toxicity.
297 Considering the widespread environmental presence of BPA, our results reinforce
298 concerns regarding its potential impact on female fertility and highlight the importance
299 of limiting exposure to this endocrine-disrupting compound.

300

301 **Funding:** This research was funded by “São Paulo Research Foundation (FAPESP),
302 grant numbers: 2020/08747-1.

303

304 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Acuña-Hernández D. G., Arreola-Mendoza L., Santacruz-Márquez R., García-Zepeda S. P., Parra-Forero L. Y., Olivares-Reyes J. A., and Hernández-Ochoa I. (2018). Bisphenol A alters oocyte maturation by prematurely closing gap junctions in the cumulus cell-oocyte complex. *Toxicol Appl Pharmacol* 344, 13–22. doi:10.1016/j.taap.2018.02.011
- Beker van Woudenberg A., Gröllers-Mulderij M., Snel C., Jeurissen N., Stierum R., and Wolterbeek A. (2012). The bovine oocyte in vitro maturation model: A potential tool for reproductive toxicology screening. *Reproductive Toxicology* 34, 251–260. doi:10.1016/j.reprotox.2012.05.098
- Bloom M. S., Kim D., vom Saal F. S., Taylor J. A., Cheng G., Lamb J. D., and Fujimoto V. Y. (2011). Bisphenol A exposure reduces the estradiol response to gonadotropin stimulation during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 96, 672-677.e2. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.06.063
- Can A., Semiz O., and Cinar O. (2005). Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *MHR: Basic science of reproductive medicine* 11, 389–396. doi:10.1093/molehr/gah179
- Desmarchais A., Têteau O., Papillier P., Jaubert M., Druart X., Binet A., Maillard V., and Elis S. (2020). Bisphenol S Impaired In Vitro Ovine Early Developmental Oocyte Competence. *Int J Mol Sci* 21, 1238. doi:10.3390/ijms21041238
- Ehrlich S., Williams P. L., Missmer S. A., Flaws J. A., Berry K. F., Calafat A. M., Ye X., Petrozza J. C., Wright D., and Hauser R. (2012). Urinary Bisphenol A Concentrations and Implantation Failure among Women Undergoing in Vitro Fertilization. *Environ Health Perspect* 120, 978–983. doi:10.1289/ehp.1104307
- Ehrlich S., Williams P. L., Missmer S. A., Flaws J. A., Ye X., Calafat A. M., Petrozza J. C., Wright D., and Hauser R. (2012). Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Human Reproduction* 27, 3583–3592. doi:10.1093/humrep/des328
- Ferris J., Favetta L. A., and King W. A. (2015). Bisphenol A Exposure during Oocyte Maturation in vitro Results in Spindle Abnormalities and Chromosome Misalignment in *Bos taurus*. *Cytogenet Genome Res* 145, 50–58. doi:10.1159/000381321
- Fujimoto V. Y., Kim D., vom Saal F. S., Lamb J. D., Taylor J. A., and Bloom M. S. (2011). Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 95, 1816–1819. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.11.008
- Hunt P. A., Koehler K. E., Susiarjo M., Hodges C. A., Ilagan A., Voigt R. C., Thomas S., Thomas B. F., and Hassold T. J. (2003). Bisphenol A Exposure Causes Meiotic Aneuploidy in the Female Mouse. *Current Biology* 13, 546–553. doi:10.1016/S0960-9822(03)00189-1
- Hunt P. A., Susiarjo M., Rubio C., and Hassold T. J. (2009). The Bisphenol A Experience: A Primer for the Analysis of Environmental Effects on Mammalian Reproduction. *Biol Reprod* 81, 807–813. doi:10.1095/biolreprod.109.077008
- Kala M., Shaikh M. V., and Nivsarkar M. (2017). Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reprod Med Biol* 16, 28–35. doi:10.1002/rmb2.12013
- Lambert A. J., and Brand M. D. (2009). Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria. pp. 165–181 doi:10.1007/978-1-59745-521-3_11

- Lee S. G., Kim J. Y., Chung J.-Y., Kim Y.-J., Park J.-E., Oh S., Yoon Y.-D., Yoo K. S., Yoo Y. H., and Kim J.-M. (2013). Bisphenol A Exposure during Adulthood Causes Augmentation of Follicular Atresia and Luteal Regression by Decreasing 17 β -Estradiol Synthesis via Downregulation of Aromatase in Rat Ovary. *Environ Health Perspect* 121, 663–669. doi:10.1289/ehp.1205823
- Machtinger R., Combelles C. M. H., Missmer S. A., Correia K. F., Williams P., Hauser R., and Racowsky C. (2013). Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Human Reproduction* 28, 2735–2745. doi:10.1093/humrep/det312
- Matuszczak E., Komarowska M. D., Debek W., and Hermanowicz A. (2019). The Impact of Bisphenol A on Fertility, Reproductive System, and Development: A Review of the Literature. *Int J Endocrinol* 2019, 1–8. doi:10.1155/2019/4068717
- Mok-Lin E., Ehrlich S., Williams P. L., Petrozza J., Wright D. L., Calafat A. M., Ye X., and Hauser R. (2010a). Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *Int J Androl* 33, 385–393. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01014.x
- Mok-Lin E., Ehrlich S., Williams P. L., Petrozza J., Wright D. L., Calafat A. M., Ye X., and Hauser R. (2010b). Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *Int J Androl* 33, 385–393. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01014.x
- Nakano K., Nishio M., Kobayashi N., Hiradate Y., Hoshino Y., Sato E., and Tanemura K. (2016). Comparison of the effects of BPA and BPAF on oocyte spindle assembly and polar body release in mice. *Zygote* 24, 172–180. doi:10.1017/S0967199415000027
- Negrón-Pérez V. M., Al Naib A., Zezeski A. L., McCracken-Harlow V. L., Perry G. A., Ealy A. D., and Rhoads M. L. (2025). Cumulus cell expansion, nuclear maturation and embryonic development of bovine cumulus-oocyte complexes matured in varying concentrations of follicular fluid. *PLoS One* 20, e0318376. doi:10.1371/journal.pone.0318376
- Pan M.-H., Wu Y.-K., Liao B.-Y., Zhang H., Li C., Wang J.-L., Hu L.-L., and Ma B. (2021). Bisphenol A Exposure Disrupts Organelle Distribution and Functions During Mouse Oocyte Maturation. *Front Cell Dev Biol* 9. doi:10.3389/fcell.2021.661155
- Patel S., Zhou C., Rattan S., and Flaws J. A. (2015). Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on the Ovary 1. *Biol Reprod* 93. doi:10.1095/biolreprod.115.130336
- Petro E. M. L., Leroy J. L. M. R., Covaci A., Fransen E., De Neubourg D., Dirtu A. C., De Pauw I., and Bols P. E. J. (2012). Endocrine-disrupting chemicals in human follicular fluid impair in vitro oocyte developmental competence. *Human Reproduction* 27, 1025–1033. doi:10.1093/humrep/der448
- Radwan P., Wielgomas B., Radwan M., Krasinski R., Klimowska A., Kaleta D., and Jurewicz J. (2020). Urinary bisphenol A concentrations and in vitro fertilization outcomes among women from a fertility clinic. *Reproductive Toxicology* 96, 216–220. doi:10.1016/j.reprotox.2020.07.009
- Raimondo S., Chiusano M. L., Gentile M., Gentile T., Cuomo F., Gentile R., Danza D., Siani L., Crescenzo C., Palmieri M., Iaccarino S., Iaccarino M., Fortunato A., Liguori F., Esposito A., Zullo C., Sosa L., Sosa L., Ferrara I., Piscopo M., Notari T., Lacatena R., Gentile A., and Montano L. (2024). Comparative analysis of the bioaccumulation of bisphenol A in the blood serum and follicular fluid of women living in two areas with different environmental impacts. *Front Endocrinol (Lausanne)* 15. doi:10.3389/fendo.2024.1392550

- vom Saal F. S., Akingbemi B. T., Belcher S. M., Birnbaum L. S., Crain D. A., Eriksen M., Farabollini F., Guillette L. J., Hauser R., Heindel J. J., Ho S.-M., Hunt P. A., Iguchi T., Jobling S., Kanno J., Keri R. A., Knudsen K. E., Laufer H., LeBlanc G. A., Marcus M., McLachlan J. A., Myers J. P., Nadal A., Newbold R. R., Olea N., Prins G. S., Richter C. A., Rubin B. S., Sonnenschein C., Soto A. M., Talsness C. E., Vandenberg J. G., Vandenberg L. N., Walser-Kuntz D. R., Watson C. S., Welshons W. V., Wetherill Y., and Zoeller R. T. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive Toxicology* 24, 131–138. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.005
- Starkov A. A. (2008). The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 37–52. doi:10.1196/annals.1427.015
- Stojkovic M., Machado S. A., Stojkovic P., Zakhartchenko V., Hutzler P., Gonçalves P. B., and Wolf E. (2001). Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. *Biol Reprod* 64, 904–909. doi:10.1095/biolreprod64.3.904
- Susiarjo M., and Hunt P. (2008). Bisphenol A exposure disrupts egg development in the mouse. *Fertil Steril* 89, e97. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.01.060
- Wang T., Han J., Duan X., Xiong B., Cui X.-S., Kim N.-H., Liu H.-L., and Sun S.-C. (2016). The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine in vitro. *Oncotarget* 7, 32554–32565. doi:10.18632/oncotarget.8689
- Welshons W. V., Nagel S. C., and vom Saal F. S. (2006). Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology* 147, s56–s69. doi:10.1210/en.2005-1159
- Yao X., Liu W., Xie Y., Xi M., and Xiao L. (2023). Fertility loss: negative effects of environmental toxicants on oogenesis. *Front Physiol* 14,. doi:10.3389/fphys.2023.1219045
- Zhang D., Ma W., Li Y.-H., Hou Y., Li S.-W., Meng X.-Q., Sun X.-F., Sun Q.-Y., and Wang W.-H. (2004). Intra-oocyte Localization of MAD2 and Its Relationship with Kinetochores, Microtubules, and Chromosomes in Rat Oocytes During Meiosis. *Biol Reprod* 71, 740–748. doi:10.1095/biolreprod.104.028282

FIGURE LEGENDS

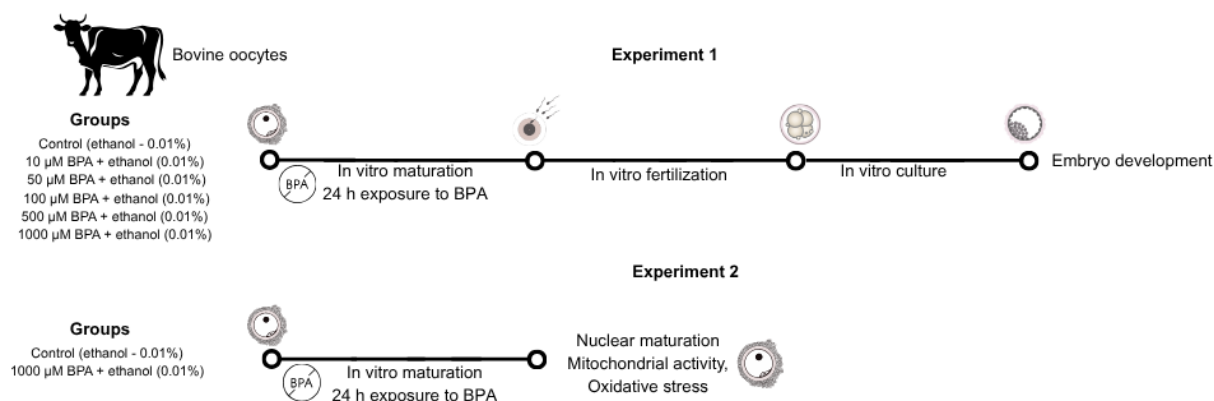


Figure 1. Experimental design for evaluating the effects of bisphenol A (BPA) during in vitro maturation (IVM) of bovine cumulus–oocyte complexes (COCs). A BPA stock solution was prepared in absolute ethanol and diluted in maturation medium to final concentrations of 10, 50, 100, 500, and 1000 μM , with ethanol standardized at 0.01% (v/v) in all groups, including the control. In Experiment 1, oocytes were assessed after 22–24 h of IVM for nuclear maturation status, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, and mitochondrial membrane potential (MMP). In Experiment 2, developmental competence was evaluated following in vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC), with cleavage rates determined on Day 3 and blastocyst formation assessed on Days 7 and 8 post-fertilization.

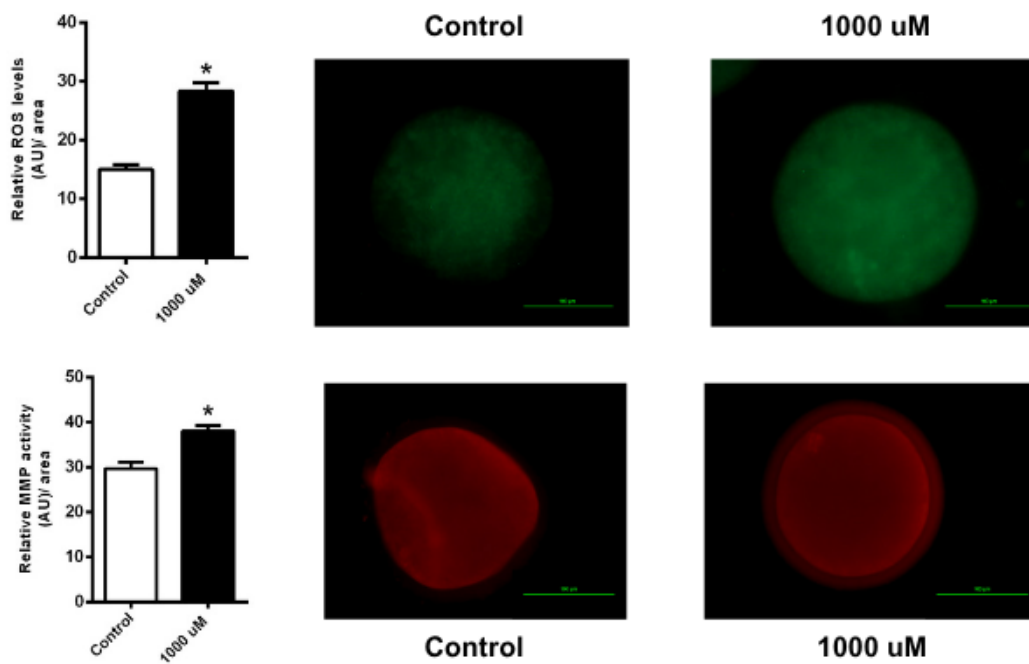


Figure 2. Effects of bisphenol A (BPA; 1000 μ M) on oxidative status and mitochondrial function in bovine cumulus-oocyte complexes (COCs) following in vitro maturation (IVM). Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels and mitochondrial membrane potential (MMP) were assessed using CellROX™ Green and MitoTracker® Red fluorescent probes, respectively. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Asterisks (*) denote statistically significant differences compared with the control group ($P < 0.05$).

TABLES

Table 1. Cleavage and blastocyst rates of bovine embryos derived from cumulus–oocyte complexes (COCs) matured in vitro with or without bisphenol A (BPA; 1000 μ M). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) and, P- value. ($P < 0.05$).

Variable	Cleavage rate (day 3)	Blastocyst rate (day 7)
P value	< 0.0001	< 0.0001
Oocytes (n)	553	553
Control	78.5 \pm 3.2	46.88 \pm 3.61
10	74.2 \pm 4.1	50.28 \pm 6.57
50	70.8 \pm 3.7	52.50 \pm 3.82
100	69.8 \pm 2.9	38.33 \pm 0.83
500	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
1000	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

Table 2. Effect of bisphenol A (BPA) on the nuclear maturation of bovine cumulus–oocyte complexes (COCs) after in vitro maturation (IVM) with or without BPA (1000 μ M). Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) and, P- value. P-values in bold are statistically significant ($P < 0.05$).

Variable	Control	BPA	P value
Oocytes (n)	454	454	-
MI Stage	14.16 \pm 3.68	4.35 \pm 4.35	0.919
MII Stage	81.38 \pm 1.76	0.00 \pm 0.00	0.037
Degenerate	4.46 \pm 2.77	95.65 \pm 4.35	0.004

ANEXO A- NORMAS DA REVISTA *ANIMAL REPRODUCTION*

Manuscript preparation guidelines

Units of measurements

Units of measurements must be used according to the International System of Units.

Abbreviations and Symbols

Abbreviations, acronyms and Symbols should be avoided, unless widely adopted. When using acronyms or abbreviations, their meaning should be fully spelled upon their first occurrence in the text.

Cover Letter

Filename: **coverletter.doc**

The cover letter must be uploaded in the submission system at the appropriate step, and should include the following elements:

Manuscript presentation

A brief presentation describing the research, highlighting why the authors believe it is suited for publication in *Animal Reproduction*. This presentation should also mention if the manuscript has already undergone evaluation by other journals and, if so, the final decision letters and reports must be uploaded in the submission system under the “Supplemental file NOT for Review”.

Data sharing statement

The authors' statement regarding deposit and availability of raw data should indicate whether the data is available and how it can be obtained. If data cannot be made available, authors should state the reason for that.

Copyright Agreement Form

Filename: **agreement.doc**

As stated in our policies, the copyright remains with the authors. However, the corresponding author is required to upload the “Animal Reproduction Authorship Responsibility, Copyright and Publishing License Agreement” (available at [this link](#)) signed on behalf of all authors.

This file must be uploaded in the submission system under the “Supplemental File NOT for Review” designation.

Main Document

Filename: **manuscript.doc**

The main document file for the manuscript must be formatted using Microsoft Word© 2010 or more recent. Pages must be set to A4 (21.0 x 29.7) size, with 3 cm margins, using Times New Roman font size 12 without unnecessary formatting, double spaced, with numbered lines and pages. Sections and subsection titles should use the built-in Heading Styles.

The main document must be structured as described in the following sections:

1. Title page

The first page of the manuscript must include the following information.

Article type

Indicate the same article type as selected in the submission system: Basic Research Article, Biotechnology Article, Applied Research Article, or Review Article.

Running title

No more than 50 letters, including spaces.

Manuscript Title

The title should be succinct but include the study design and major findings.

Title words should be in bold, with only the first letter of the first word in uppercase.

Authorship byline

The full names of all authors are to be listed below the title. Follow each name with superscript Arabic numerals to indicate their affiliations, and include the ORCID URL of all authors in parenthesis. An asterisk (*) must be used to indicate the corresponding author.

Example:

Rex Rex A. Hess^{1,2} (<https://orcid.org/0000-0003-2345-6789>), Kay
Carnes² (<https://orcid.org/0000-0002-2345-6789>), Luiz Renato
França^{3*} (<https://orcid.org/0000-0001-2345-6789>)

⇒ Authors who do not have an ORCID must register at <https://orcid.org>.

Affiliations

Author affiliations should be listed below the authors' names using the same superscript Arabic numerals used in the byline. The affiliation list must include only institutions where each author actually carried out work related to the article.

Names of Institutions should be written in their original language or English when not in Roman alphabet.

Example:

¹ Full Institution Name, Department, City, State, Country

² Nome da Instituição no seu Idioma de Origem, Department, City, State, Country

³ Full Institution Name, Department, City, State, Country

Correspondence information

The Corresponding author's name, email and postal address should be listed after the affiliations and identified with an asterisk (*).

Example:

* Correspondence: Full Author Name, corresponding@author.email.com, full postal address.

2. Abstract

The purpose of the work must be clearly and briefly stated and include the methods and summarized conclusions. Word number limit: 300 words.

3. Keywords

Keywords should be listed after the abstract. Maximum of five keywords.

4. Introduction

This section should provide background information leading to the hypothesis tested. It should end with a very brief statement of the objectives of the work.

5. Methods

The methods should include the design of the study, type of materials involved, number of animals per group, a clear description of all methods used and/or clear references to published methods, and the type of analysis used.

Information about registration and ethics committee approval must be insert at the end of this section, including a complete description of data and location where the experiment was conducted, and required authorizations for animal or animal tissue obtained.

6. Results

Main results found should be clearly and objectively stated. This section may be broken into subsections with short, informative headings.

7. Discussion

This section may be broken into subsections with short, informative headings. The discussion should be focused on the results found. It is recommended that the main conclusions supported by the research data be stated as a last paragraph.

8. Conclusion

Main conclusions supported by the research data and discussion must be clearly and objectively stated.

9. Acknowledgments

Collaborators that do not meet the authorship criteria as stated in our policies should be mentioned in this section if they have granted their permission.

10. References

The references section must begin on a new page and follow the Vancouver style, as described ahead. All references must be cited and the correctness of all information is the author's responsibility.

11. Tables

A set of alphanumeric data that is organized in lines and columns. All tables must be included at the end of manuscript, each on a separate page. Tables must be as simple as possible, and only horizontal lines should be used at the top and bottom of the table. Table cells must never be split with diagonal lines. The table legends must precede it and start with the word "Table" followed by its number in Arabic numerals. Tables must be cited in the text as Table 1, Table 2, etc., in the order that they are included. All abbreviations or annotations should be explained in footnotes; if necessary, symbols should be used to include the explanations (*, †, ‡, §, etc.).

12. Figures and figure legends

Any illustration that contains line drawings, photographs, graphics, schemes, flowcharts, etc. should be cited as figures. Each figure should be identified and submitted in a separate high-resolution file, making sure that the smallest text is perfectly readable. The list of figure legends should begin on a new page at the end of the manuscript. Figures must be cited in the numerical order that they are listed; e.g., Fig. 1, Fig. 2, Figs. 1-2, etc.

When necessary, authors are responsible to collect appropriate authorization to use images, pictures and illustrations from other sources according to their original copyright owner and include proper citation.

References and citation style

The references section must follow the Vancouver style. A small sample of the most commonly used bibliographic references is included ahead. An extensive list with many more examples and details is available at http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

All references must be cited and the correctness of all information is the author's responsibility.

References must be listed first in alphabetical order, then by year using lower case letters to differentiate references of the same authors and year.

Use "in press" only when formal acceptance has been granted.

Text citations

All references must be cited using the Author-Date style as shown in the following examples:

1. sole author: (Ginther, 1992) or Ginther (1992).
2. two authors: (Varley and Foxcroft, 1990) or Varley and Foxcroft (1990).
3. more than two authors: (Quintero et al., 2000) or Quintero et al. (2000).
4. more than one paper cited: (Varley and Foxcroft, 1990; Ginther, 1992; Gastal et al., 1999a, b; Quintero et al., 2000) or Varley and Foxcroft (1990); Ginther (1992); Gastal et al. (1999a, b); Quintero et al. (2000), always cited in ascending chronological order.

Reference style sample list

For ARTICLES IN JOURNALS:

- Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Experimental assumption of dominance by a smaller follicle and associated hormonal changes in mares. *Biol Reprod.* 1999a;61(3):724-30. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod61.3.724>. PMID:10456850.
- Gastal EL, Donadeu FX, Gastal MO, Ginther OJ. Echotextural changes in the follicular wall during follicle deviation in mares. *Theriogenology.* 1999b;52(5):803-14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00173-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00173-9). PMID:10735121.
- Hess RA, Carnes K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim Reprod.* 2004;1:5-30.
- Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod.* 2004;1:86-90.

- Varley MA, Foxcroft GR. Endocrinology of lactating and weaned sow. *J Reprod Fertil Suppl.* 1990;40:47-61. PMID:2192052.

For BOOKS, DISSERTATIONS AND CONFERENCES:

- Basrur PK, Kochhar HS. Inherited sex abnormalities in goats. In: Youngquist RS, Threlfall WR, editors. *Current therapy in large animal theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 590-4.
- Ginther OJ. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. 2nd ed. Cross Plains: Equiservices Publishing; 1992. p. 105-72.
- Leal MC. Análise morfológica e funcional do testículo e eficiência espermatogênica em *Saguia Callithrix penicillata* (Primates: Callitrichidae) [dissertation]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004. Portuguese.
- Quintero B, Porter M, Sharp D, Cleaver B, Diaz T. Effect of season on LH concentrations and LH pulse dynamics in mares located in the tropics. In: *Abstracts of the 14th International Congress on Animal Reproduction*; 2000 Jul 2-6; Stockholm, Sweden. Stockholm: ICAR; 2000. p. 290.

For ELECTRONIC DOCUMENTS:

CD-ROM:

- Anderson SC, Poulsen KB. *Anderson's electronic atlas of hematology* [CD-ROM]. 2nd version. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. 1 CD-ROM: color, 4 3/4 in.

Journal article on the Internet:

- Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2019 Jul 25];102(6):[about 3 p.]. Available from: https://journals.lww.com/ajnonline/Abstract/2002/06000/Quality_Improvement_Initiative_in_Nursing_Homes.31.aspx.

Monograph on the Internet:

- Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer* [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2019 Jul 25]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site:

- *Cancer Pain* [homepage on the Internet]. New York: American Cancer Society; 2019 [cited 2019 Jul 25]. Available from: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/pain.html>.

Part of a homepage/Web site:

- AMA [homepage on the Internet]. Chicago: American Medical Association; 1995-2019. What's healthy dying? 6 steps on the path for doctors to know; 2019 Jul 22 [cited 2019 Jul 25]; [about 2 screens]. Available from: <https://www.ama-assn.org/delivering-care/ethics/what-s-healthy-dying-6-steps-path-doctors-know>.

Open database on the Internet:

- Who's Certified [database on the Internet]. Alexandria (VA): American Board of Facial Plastic and Reconstructive Surgery; 2019 [cited 2019 Jul 25]. Available from: <https://www.abfprs.org/certified/disclaimer>.

Closed database on the Internet:

- Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly, Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2001 [cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

Part of a database on the Internet:

- MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2002. Meta-analysis; unique ID: D015201; [cited 2003 Jun 10]; [about 3 screens]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

For NON PUBLISHED WORK:

- It should be mentioned only in the text, and not in the list of references.

For VERBAL INFORMATION:

- References concerning unpublished data and “personal communications” should not be cited in the reference list, but should be mentioned in the text. After the information, the author must write the expression “verbal information” or “personal communication”.