UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dipartimento di Sanità pubblica, Medicina sperimentale e forense

Micro- e nanoplastiche nel sistema riproduttivo femminile: dall'alterazione ovarica allo stress ovocitario

Relatore:
Prof.ssa Manuela Monti

Correlatore:
Dott.ssa Beatrice Camia

Tesi Sperimentale di
Ilaria Bighini

Anno Accademico 2025/2026

INTRODUZIONE 3

1. Oogenesi e sviluppo dell'oocita 3

1.1 Ovaio: organizzazione e struttura 3

1.2 Oogenesi 4

1.3 Sviluppo e maturazione dell'oocita 6

1.4 Follicologenesi e sviluppo del follicolo 8

2. Plastiche 11

2.1 Plastiche: caratteristiche e diffusione 11

2.2 Microplastiche e nanoplastiche 13

2.3 Caratteristiche delle nanoplastiche e loro potenziale impatto biologico 15

3. Effetti delle plastiche sulla riproduzione femminile 17

3.1 Esposizione e distribuzione nell'apparato riproduttivo femminile 17

3.2 Meccanismi coinvolti nella tossicità riproduttiva 18

3.3 Effetti ovarici delle MNP: alterazioni follicolari e ovocitarie 20

3.4 Effetti sulla gravidanza, sviluppo embrio-fetale e progenie 22

SCOPO DEL LAVORO 24

MATERIALI E METODI 25

Dichiarazione etica: 25

1. Preparazione dei campioni istologici 25

Disegno sperimentale e trattamento degli animali 25

1.1 Fissazione, inclusione e colorazione delle sezioni di ovario 26

1.2 Analisi in microscopia ottica 28

2. Maturazione *in vitro* degli oociti murini 28

Disegno sperimentale 28

2.1 Isolamento delle ovaie 28

2.2 Isolamento degli oociti 29

2.3 Maturazione *in vitro* 29

2.4 Valutazione della maturazione ovocitaria 29

3. Analisi mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) 29

Principio della tecnica 29

3.1 Fotoconversione e visualizzazione 30

4. Valutazione dei livelli intracellulari di ROS 30
Principio della tecnica 30
4.1 Marcatura degli oociti con DCFH-DA 31
4.2 Analisi in microscopia confocale.....31
RISULTATI 32
1. Analisi *in vivo* degli effetti delle microplastiche 32
1.1 Parametri relativi all'esposizione 32
1.2 Analisi morfo-istologica dell'ovaio 35
1.3 Analisi statistica dei conteggi follicolari 43
2. Analisi *in vitro* degli effetti delle nanoplastiche 46
2.1 Maturazione *in vitro* degli oociti 46
2.2 Valutazione dell'internalizzazione delle nanoplastiche negli oociti.....48
2.3 Valutazione dello stress ossidativo mediante analisi dei ROS.....49
DISCUSSIONE 57
1. Effetti delle microplastiche sulla morfologia ovarica e sulla follicologenesi 57
1.1 Alterazioni della struttura ovarica.....57
1.2 Distribuzione dei follicoli e atresia.....58
1.3 Cellule della granulosa in divisione.....59
2. Effetti delle nanoplastiche sugli oociti nel modello murino *in vitro* 60
2.1 Esposizione alle nanoplastiche e maturazione ovocitaria.....60
2.2 Internalizzazione delle nanoplastiche negli oociti.....63
2.3 Esposizione alle nanoplastiche e stress ossidativo 64
CONCLUSIONI.....67
BIBLIOGRAFIA 69

INTRODUZIONE

1. Oogenesi e sviluppo dell'oocita

1.1 Ovaio: organizzazione e struttura

Le ovaie sono le gonadi femminili e rappresentano gli organi primari dell'apparato riproduttivo femminile. Sono due organi pari e parenchimatosi, situati nei quadranti inferiori destro e sinistro dell'addome. Questi organi sono fondamentali nella gametogenesi femminile e nella produzione degli ormoni sessuali [1, 2].

Dal punto di vista microanatomico, l'ovaio può essere suddiviso in tre principali regioni: corteccia, midollare e ilo (***Fig. 1***). La superficie ovarica è rivestita da un epitelio cubico semplice, chiamato epitelio germinale, al di sotto del quale si trova la tunica albuginea, costituita prevalentemente da tessuto connettivo ricco di collagene. La regione corticale, situata più esternamente, contiene i follicoli ovarici nei diversi stadi di sviluppo e maturazione. Più internamente si trova la regione midollare, caratterizzata da tessuto connettivo lasso e dalla presenza di una ricca rete di vasi sanguigni e nervi. L'ilo rappresenta invece la regione maggiormente vascolarizzata e costituisce la sede di ingresso e uscita di vasi e nervi [2].

L'ovaio svolge una duplice funzione: riproduttiva ed endocrina. Dal punto di vista endocrino, a partire dalla pubertà, l'attività ovarica è regolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, attraverso la quale l'ipotalamo rilascia in modo pulsatile l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH, *Gonadotropin Releasing Hormone*), stimolando le cellule dell'ipofisi anteriore alla secrezione degli ormoni gonadotropi: ormone follicolo-stimolante (FSH, *Follicle-Stimulating Hormone*) e ormone luteinizzante (LH, *Luteinizing Hormone*). Questi ormoni regolano lo sviluppo follicolare, l'ovulazione e la produzione degli ormoni sessuali, tra cui estrogeni e progesterone. Dal punto di vista riproduttivo invece, l'ovaio costituisce la sede in cui gli oociti si sviluppano e maturano. A partire dalla pubertà, una parte degli oociti precedentemente arrestati in profase I riprende progressivamente la meiosi in associazione alla maturazione follicolare. Ad ogni ciclo, un gruppo di follicoli viene reclutato e prosegue lo sviluppo e, generalmente, un singolo follicolo dominante raggiunge lo stadio preovulatorio e rilascia l'oocita maturo durante l'ovulazione, evento scatenato dal picco di LH. La maggior parte degli altri follicoli va invece incontro ad atresia.

La funzione riproduttiva dell'ovaio è resa possibile dalla stretta interazione tra la componente germinale, rappresentata dagli oociti, e quella somatica, che comprende le

cellule della granulosa, della teca e dello stroma. Queste popolazioni cellulari comunicano e cooperano tra di loro durante lo sviluppo follicolare, fornendo all'oocita il supporto necessario per la crescita e la maturazione. Le gonadotropine ipofisarie esercitano la loro azione principalmente sulle cellule somatiche follicolari: l'FSH agisce sulle cellule della granulosa, sostenendone la proliferazione e la funzione durante lo sviluppo follicolare, mentre l'LH agisce prevalentemente sulle cellule della teca, stimolandone la produzione di androgeni, usati dalle cellule della granulosa come precursori per la sintesi dell'estradiolo, uno dei principali estrogeni che durante la pubertà porta allo sviluppo dei caratteri sessuali secondari. L'azione coordinata di queste popolazioni cellulari e dei segnali endocrini consente quindi di sincronizzare lo sviluppo del follicolo con la crescita e la maturazione dell'oocita [2].

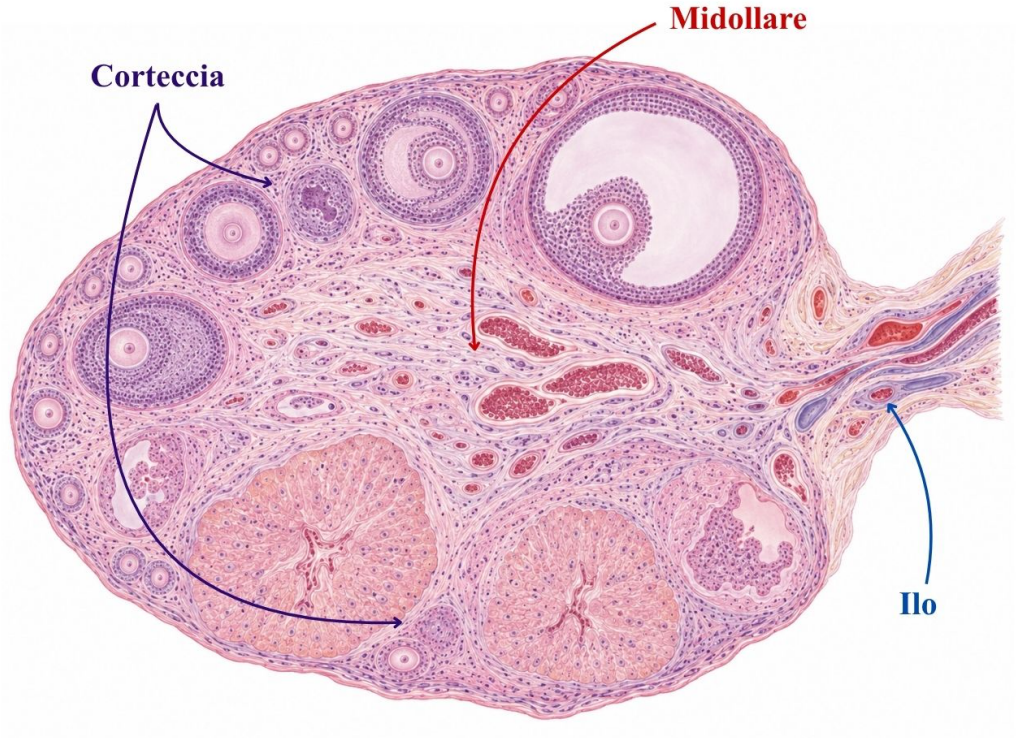


***Figura 1**: Sezione trasversale di un ovaio, in cui sono evidenziate la regione corticale, la regione midollare e l'ilo ovarico.*

1.2 Oogenesi

L'oogenesi, nota anche come gametogenesi femminile, è il processo attraverso il quale le cellule germinali primordiali femminili (PGCs, *Primordial Germ Cells*) si differenziano e maturano fino alla formazione dell'oocita maturo, il gamete femminile.

Questo processo ha inizio durante lo sviluppo fetale, con la migrazione e l'invasione delle PGCs verso la cresta genitale, precursore delle gonadi di entrambi i sessi. La migrazione delle PGCs è un processo attivo, guidato principalmente da movimenti cellulari e gradienti chemiotattici, attraverso il quale le cellule raggiungono e colonizzano la gonade in via di sviluppo. A seguito della differenziazione della gonade in senso femminile e della conseguente formazione dell'ovaio, le PGCs vanno incontro ad una fase di intensa proliferazione mitotica, durante la quale danno origine a diversi milioni di oogoni [3, 4].
Gli oogoni vanno incontro a successive divisioni mitotiche caratterizzate da una citocinesi incompleta, determinando la formazione di piccoli aggregati cellulari chiamati "nidi germinali". La proliferazione degli oogoni dura diverse settimane e si sovrappone al loro progressivo ingresso in meiosi che avviene in modo asincrono. Una volta entrati in meiosi, gli oogoni vengono definiti oociti primari [4, 5].

La meiosi comprende due successive divisioni cellulari che sono rispettivamente la meiosi I e la meiosi II, precedute da un'unica fase di replicazione del DNA; la prima è una divisione riduzionale, durante la quale avviene la separazione dei cromosomi omologhi, mentre la seconda è una divisione equazionale, durante la quale avviene la separazione dei cromatidi fratelli [6].
La meiosi I inizia con la profase I, una fase complessa suddivisa in cinque stadi: leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi. Nel leptotene avviene la ricombinazione meiotica generando rotture a doppio filamento del DNA (DSB, *Double-Strand Break*). Successivamente, nella fase di zigotene, i cromosomi omologhi iniziano ad appaiarsi e si forma il complesso sinaptonemico, un'impalcatura proteica che tiene insieme i cromosomi; l'appaiamento dei cromosomi omologhi viene completato nello stadio di pachitene, nel quale avviene anche il fenomeno di *crossing-over*, processo attraverso cui si verifica lo scambio di materiale genetico tra i cromosomi omologhi. Durante il diplotene, il complesso sinaptonemico si disassembla e i cromosomi omologhi iniziano a separarsi, rimanendo tuttavia associati in corrispondenza dei chiasmi, manifestazione fisica del *crossing-over*. Nell'oogenesi, gli oociti primari si arrestano in questo stadio, entrando in una lunga fase di arresto meiotico denominata dittiato. Tale arresto si protrae per diversi decenni nella specie umana (alcuni mesi nel topo), fino alla ripresa della meiosi a partire dalla pubertà, in risposta ai segnali ormonali che regolano la maturazione follicolare e ovocitaria [7] (***Fig. 2***).

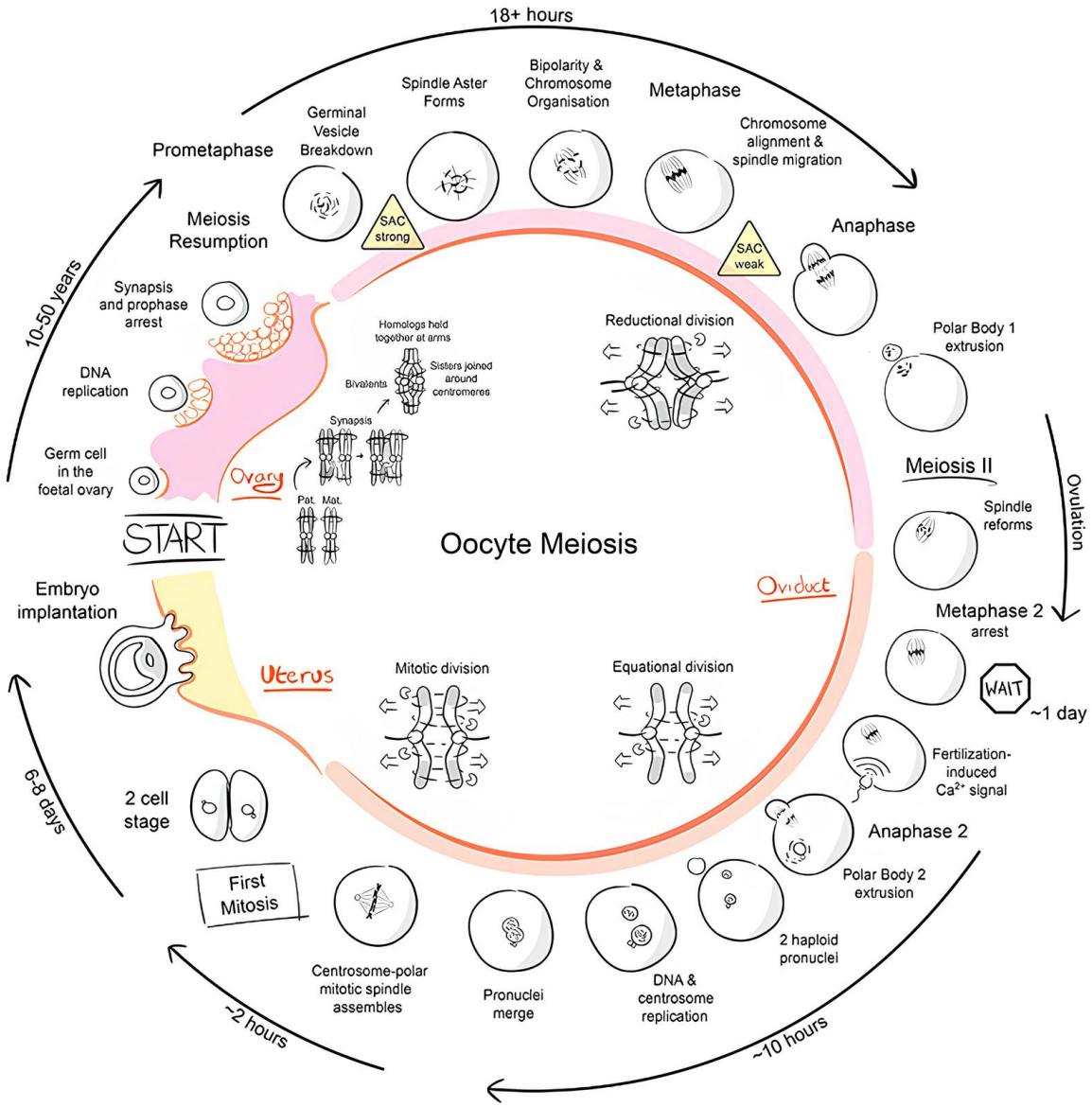


Figura 2. *Rappresentazione schematica delle principali fasi della meiosi femminile nell'essere umano. Immagine tratta da Wetherall B et al, 2026 [5].*

1.3 Sviluppo e maturazione dell'oocita

Una volta raggiunta la maturità sessuale, alcuni oociti primari precedentemente arrestati in diplotene riprendono la meiosi in risposta al picco dell'ormone luteinizzante. Durante l'arresto meiotico, il nucleo dell'oocita, delimitato dalla membrana nucleare, è definito vescicola germinale (GV, *Germinal Vesicle*) [8].

Il mantenimento dell'arresto meiotico è regolato principalmente da alti livelli intracellulari di adenosina 3',5'-monofosfato ciclico (cAMP, *Cyclic Adenosine Monophosphate*), che impediscono la progressione dell'oocita e ne mantengono l'arresto allo stadio di GV. I livelli

di cAMP intracellulari sono regolati attraverso una stretta comunicazione tra l'oocita e le cellule somatiche che lo circondano. In particolare, l'oocita stesso e le cellule del cumulo (cellule della granulosa specializzate che lo circondano direttamente) contribuiscono alla produzione di cAMP. Le cellule della granulosa producono inoltre il cGMP, il quale raggiunge l'oocita tramite le giunzioni comunicanti. Questo meccanismo è fondamentale poiché il cGMP inibisce l'attività della fosfodiesterasi 3A (PDE3A, *Phosphodiesterase 3A*), responsabile della degradazione del cAMP. In questo modo vengono mantenuti elevati i livelli intracellulari di cAMP, contribuendo all'arresto meiotico [9].

In seguito al picco preovulatorio di LH, si verificano modificazioni nella comunicazione tra l'oocita e le cellule somatiche circostanti, con conseguente riduzione dei livelli di cGMP all'interno dell'oocita. Questo determina l'attivazione della PDE3A e quindi la progressiva degradazione del cAMP, favorendo così la ripresa della meiosi [9]. A livello cellulare, la ripresa meiotica è caratterizzata da una serie di modificazioni nucleari che culminano nella rottura dell'involucro nucleare e nella conseguente scomparsa della vescicola germinale, evento noto come GVBD (*Germinal Vesicle Breakdown*). In seguito alla GVBD, l'oocita prosegue la meiosi I fino al raggiungimento della metafase I, durante la quale i cromosomi omologhi si allineano sul fuso meiotico. Il completamento della prima divisione meiotica determina la separazione dei cromosomi omologhi e l'estrusione del primo globulo polare [8].

Le divisioni meiotiche dell'oocita sono estremamente asimmetriche e questa asimmetria si esplica in una diversa distribuzione citoplasmatica. A differenza della spermatogenesi, infatti, le divisioni cellulari portano alla formazione di una singola cellula di grandi dimensioni, l'oocita, e di due piccoli globuli polari: il primo estruso al termine della meiosi I e il secondo al completamento della meiosi II. Questa asimmetria è essenziale per mantenere le riserve materne accumulate durante l'oogenesi, al fine di sostenere lo sviluppo embrionale [10].

Dal completamento della meiosi I ha origine l'oocita secondario, che entra in meiosi II senza una nuova fase di replicazione del DNA e si arresta in metafase II. L'oocita secondario, arrestato in metafase II, viene successivamente rilasciato dal follicolo ovarico durante l'ovulazione e rimane in questo stadio fino all'eventuale fecondazione [8]. Sarà quindi l'ingresso dello spermatozoo ad indurre la ripresa della meiosi II, portando alla separazione dei cromatidi fratelli e l'estrusione del secondo globulo polare, determinando infine il completamento della meiosi e la formazione del gamete femminile maturo [11] (***Fig. 2***).

1.4 Follicologenesi e sviluppo del follicolo

La follicologenesi è un processo molto complesso e finemente regolato durante il quale la crescita e il differenziamento del follicolo ovarico procede parallelamente alla crescita e alla maturazione dell'oocita. Lo sviluppo del follicolo è caratterizzato da cambiamenti morfologici e funzionali delle cellule follicolari, in particolare delle cellule della granulosa che circondano l'oocita, e da una stretta comunicazione tra la componente germinale e quella somatica. Questo processo è associato a una regolazione trascrizionale dinamica sia nell'oocita che nelle cellule della granulosa, fondamentale per garantire il corretto sviluppo e la maturazione follicolare [12, 13].

La follicologenesi ha inizio con la formazione dei follicoli primordiali, che rappresentano il primo stadio dello sviluppo follicolare. Nell'uomo questo processo inizia durante la vita fetale: gli oogoni, dopo una fase di intensa proliferazione e la formazione dei nidi germinali, iniziano la meiosi e si differenziano in oociti primari, i quali si arrestano allo stadio di diplotene. Successivamente, i nidi germinali si disgregano e gli oociti vengono progressivamente circondati da uno strato di cellule somatiche appiattite chiamate cellule pregranulose, dando origine ai follicoli primordiali [15] (***Fig. 3 A***). L'insieme dei follicoli primordiali rappresenta la principale componente della riserva ovarica, costituita da una popolazione finita di oociti che non viene rinnovata. Infatti, già durante la vita fetale si verifica una considerevole perdita di oociti e solo una parte di essi viene incorporata nei follicoli primordiali. Questa riserva ovarica si riduce progressivamente nel corso della vita riproduttiva, principalmente a causa dell'atresia follicolare, determinando un progressivo esaurimento degli oociti [13, 14].

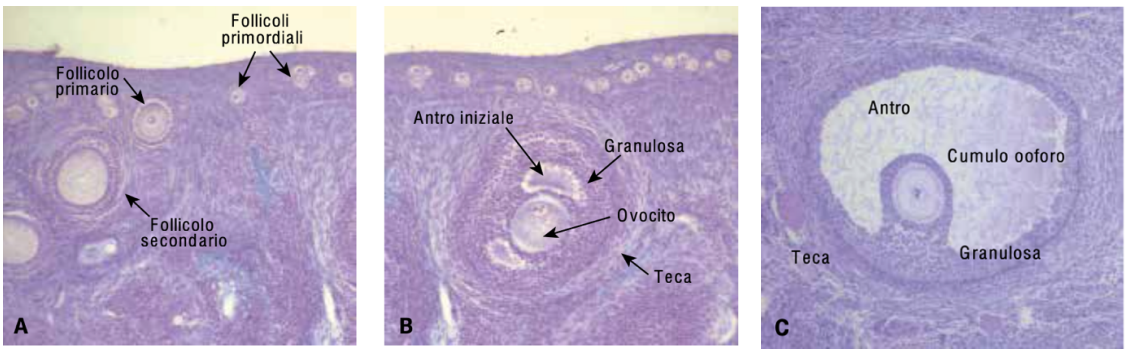


Figura 3*. Sezioni istologiche dell'ovaio che mostrano i diversi stadi dello sviluppo follicolare: (A) follicoli primordiali, primari e secondari; (B) follicolo in fase di sviluppo con formazione iniziale dell'antro; (C) follicolo antrale. Immagine tratta da Salustri A, 2014 [13].*

I follicoli primordiali possono rimanere in uno stato quiescente per periodi prolungati. Tuttavia, una parte di essi viene continuamente attivata da segnali intraovarici e avvia il processo di crescita follicolare, passando allo stadio di follicolo primario (***Fig. 3 A***). Questa transizione, definita anche reclutamento iniziale, è caratterizzata da importanti modificazioni sia delle cellule somatiche che dell'oocita. Le cellule pregranulose diventano cubiche e proliferative, trasformandosi nelle cellule della granulosa e formando un singolo strato attorno all'oocita. Contemporaneamente, l'oocita aumenta progressivamente di volume e presenta un'intensa attività di sintesi di RNA e proteine, che vengono accumulate nel citoplasma e utilizzate nei successivi stadi di maturazione e nelle prime fasi embrionali. In questa fase inizia inoltre la formazione della zona pellucida (ZP), una matrice extracellulare costituita da glicoproteine, tra cui ZP1, ZP2 e ZP3 nel topo, che si interpone tra l'oocita e le cellule della granulosa. La zona pellucida è attraversata da sottili prolungamenti delle cellule della granulosa, che entrano in contatto con l'oocita e permettono lo scambio di molecole e nutrienti, contribuendo al suo sviluppo e alla sua crescita. Questa funge anche da barriera, impedendo la penetrazione di ulteriori spermatozoi dopo la fecondazione [13, 14].

La rapida proliferazione delle cellule della granulosa determina la transizione dal follicolo primario, costituito da un singolo strato di cellule (unilaminare) al follicolo secondario, caratterizzato dalla presenza di più strati di cellule della granulosa (multilaminare) che circondano l'oocita in crescita (***Fig. 3 A***). Le cellule della granulosa, a loro volta, sostengono attivamente la crescita dell'oocita, che aumenta progressivamente di volume. Parallelamente, le cellule del tessuto connettivo circostante si organizzano in strati concentrici formando la teca follicolare, separata dalle cellule della granulosa mediante una membrana basale (***Fig. 3 B***). Le cellule della teca si differenziano in uno strato interno, la teca interna, altamente vascolarizzata, e uno strato esterno, la teca esterna, più ricca di fibre connettivali. In questa fase, le cellule della granulosa iniziano anche ad esprimere i recettori per l'ormone follicolo-stimolante (FSH), mentre le cellule della teca interna esprimono i recettori per l'ormone luteinizzante (LH), preparando il follicolo alle successive fasi di sviluppo [13, 15].

Quando le cellule della granulosa hanno formato circa 6-10 strati attorno all'oocita, iniziano a comparire tra le cellule piccoli spazi contenenti liquido follicolare, che presto confluiscono formando un'unica cavità denominata antro follicolare (***Fig. 3 B***). La formazione dell'antro caratterizza il passaggio dal follicolo preantrale a quello antrale. In questa fase l'oocita

raggiunge le sue dimensioni definitive (circa 120 µm) e cessa progressivamente di crescere, mentre il follicolo continua ad ingrandirsi [13]. Con l'espansione dell'antro, l'oocita assume una posizione eccentrica e rimane circondato dalle cellule della granulosa, le quali col tempo si differenziano in due sottocategorie: le cellule del cumulo ooforo che circondano direttamente l'oocita, e le cellule della granulosa murale che rivestono la parete follicolare [15]. Tra le cellule del cumulo ooforo, quelle più interne costituiscono la corona radiata e mantengono il contatto con l'oocita attraverso prolungamenti citoplasmatici che attraversano la zona pellucida [13] (***Fig. 3 C***).

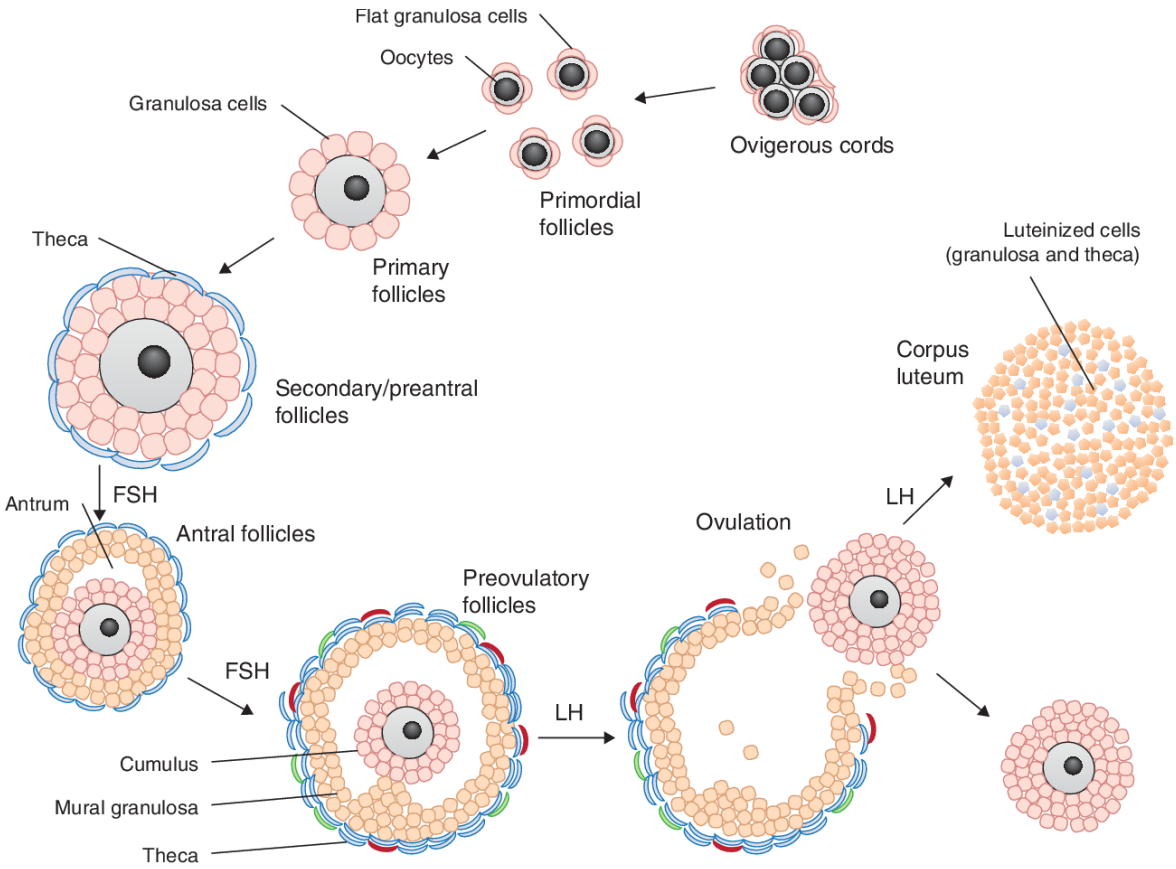


Figura 4. *Principali fasi della follicologenesi, dalla formazione dei follicoli primordiali allo sviluppo del follicolo preovulatorio, fino all'ovulazione e alla formazione del corpo luteo. Immagine tratta da Georges A et al, 2013 [16].*

La maggior parte dei follicoli antrali va incontro ad atresia e solo una piccola parte prosegue lo sviluppo fino a raggiungere lo stadio di follicolo maturo o di Graaf. A questo stadio, il

follicolo diventa sensibile alle variazioni cicliche delle gonadotropine e, sotto l'azione dell'FSH, continua a crescere rapidamente fino a raggiungere le dimensioni necessarie per l'ovulazione. Il follicolo dominante è quindi quello che completa la maturazione, mentre gli altri vanno incontro ad atresia. In seguito al picco preovulatorio di LH, le cellule del cumulo ooforo vanno incontro ad un processo di espansione chiamato "mucificazione del cumulo ooforo", determinato dalla secrezione di una matrice extracellulare ricca di acido ialuronico. Questo evento favorisce il distacco del complesso cumulo-oocita dalla parete follicolare e la successiva rottura del follicolo determina il rilascio dell'oocita; questo processo è denominato ovulazione [13].

Dopo l'ovulazione, quello che rimane del follicolo maturo, costituito dalle cellule della granulosa e della teca, si trasforma nel corpo luteo attraverso il processo di luteinizzazione. Durante questo processo, le cellule della granulosa e della teca si trasformano in cellule luteiniche che secernono progesterone in grandi quantità ed estrogeni in quantità minore. In assenza di fecondazione, il corpo luteo (definito corpo luteo mestruale) regredisce progressivamente, determinando anche una drastica riduzione della produzione ormonale, fino a trasformarsi in una cicatrice bianca chiamata corpo albicante, struttura che persiste per diversi mesi e poi scompare lentamente. Se invece l'oocita viene fecondato, il corpo luteo (definito corpo luteo gravidico) continua a secernere progesterone ed estrogeni, i quali esercitano un'azione di *feedback* negativo sull'asse ipotalamo-ipofisario, inibendo la liberazione di FSH e LH per impedire la maturazione e l'ovulazione di ulteriori follicoli. La fusione dell'oocita con lo spermatozoo dà quindi inizio allo sviluppo dello zigote e alle successive fasi dello sviluppo embrionale [13] (***Fig. 4***).

2. Plastiche

2.1 Plastiche: caratteristiche e diffusione

La plastica rappresenta uno dei materiali più rivoluzionari sviluppati dall'uomo, tanto da essere definita un "materiale con mille usi" [17]. Si tratta di un materiale estremamente versatile, il cui impiego si è progressivamente esteso a numerosi ambiti della vita quotidiana e dell'industria [18].

Il termine "plastica" deriva dal greco *Plasticos*, che significa "capace di essere modellato". Dal punto di vista chimico, le plastiche sono materiali polimerici costituiti da macromolecole formate dalla ripetizione di unità strutturali più semplici, chiamati monomeri. I monomeri si uniscono attraverso legami covalenti mediante il processo di

polimerizzazione, dando origine a lunghe catene polimeriche. La polimerizzazione può avvenire principalmente per "addizione", in cui i monomeri vengono combinati mantenendo la loro struttura originale, o per "condensazione", in cui invece la struttura dei monomeri viene modificata durante il processo, con conseguente formazione di sottoprodotti. Secondo *l'International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), la plastica è un materiale polimerico che può contenere altre sostanze allo scopo di migliorarne le prestazioni e/o ridurne i costi [17].

Le numerose proprietà delle plastiche, tra cui leggerezza, tenacità, elevata resistenza, rigidità, flessibilità e bassi costi di produzione ne hanno favorito l'impiego in una vasta gamma di applicazioni, dagli imballaggi alimentari alle applicazioni tecnologiche. Tuttavia, alcune di queste caratteristiche, in particolare l'elevata durabilità e resistenza alla degradazione, rappresentano anche uno dei principali fattori responsabili della loro persistenza nell'ambiente. La degradazione delle plastiche può infatti richiedere tempi molto lunghi, favorendone l'accumulo nei diversi compartimenti ambientali [17, 19].

Sebbene i primi materiali plastici siano stati sviluppati nella seconda metà del XIX secolo, la loro produzione e diffusione su larga scala si sono affermate principalmente a partire dalla metà del XX secolo, in particolare dopo la fine della Seconda Guerra Mondiale. Da allora, la produzione mondiale di plastica ha registrato un notevole incremento, passando da circa 2 milioni di tonnellate nel 1950 a 368 milioni di tonnellate nel 2019. Parallelamente alla crescente produzione e al diffuso utilizzo di questi materiali, si è verificato un drastico aumento della quantità di rifiuti plastici, con conseguente accumulo e dispersione nell'ambiente [17, 19].

Una volta dispersi nell'ambiente, i rifiuti plastici possono accumularsi in diversi habitat naturali e andare incontro a processi di degradazione indotti da fattori fisici, chimici e ambientali. L'esposizione alle radiazioni ultraviolette, ad esempio, può innescare processi di foto-ossidazione che alterano la struttura del materiale, rendendolo più fragile e favorendone la frammentazione. La persistenza e il progressivo accumulo dei rifiuti plastici nei diversi compartimenti ambientali hanno pertanto sollevato crescenti preoccupazioni riguardo alle loro potenziali conseguenze sull'ambiente e sugli organismi. La degradazione e la frammentazione dei materiali plastici possono infatti generare particelle di dimensioni progressivamente minori, contribuendo alla presenza e alla diffusione nell'ambiente di microplastiche e nanoplastiche [17, 19].

2.2 Microplastiche e nanoplastiche

In base alle loro dimensioni, i detriti plastici presenti nell'ambiente possono essere classificati in diverse categorie: macroplastiche, mesoplastiche, microplastiche e nanoplastiche. Secondo lo standard internazionale ISO 24187:2023 (*International Organization for Standardization*), i detriti plastici comprendono macroplastiche, di dimensioni superiori a 25 mm, mesoplastiche, comprese tra 5 e 25 mm, microplastiche (MP, *Microplastics*), con dimensioni comprese tra 5 mm e 1 µm, e nanoplastiche (NP, *Nanoplastics*), di dimensioni inferiori a 1 µm (***Fig. 5***).

Sebbene in letteratura siano state proposte differenti classificazioni dimensionali, la terminologia ISO rappresenta un riferimento utile per migliorare la comparabilità tra gli studi di monitoraggio ambientale [20].

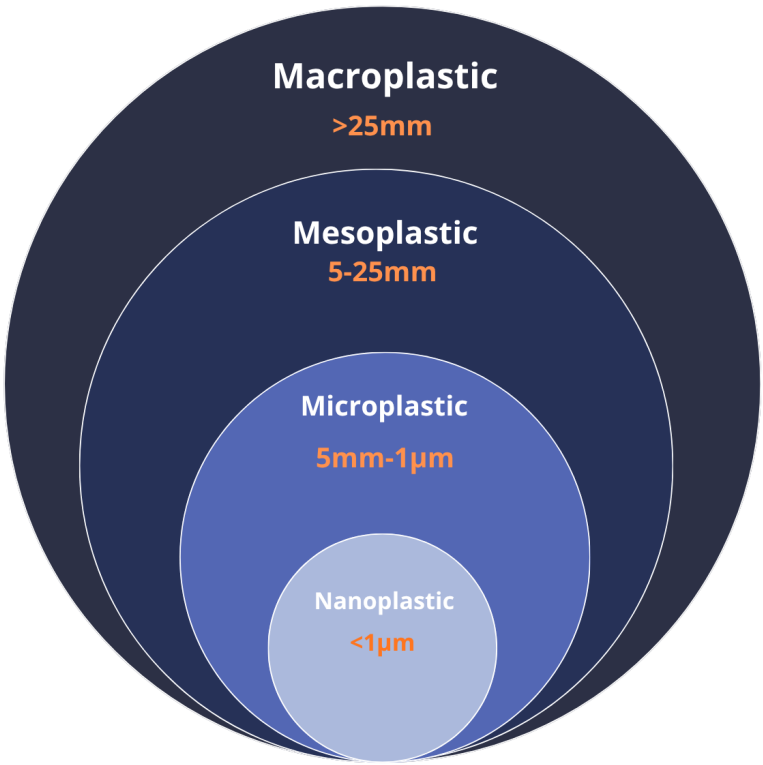


Figura 5. *Classificazione dei detriti plastici in base alle dimensioni secondo lo standard internazionale ISO 24187:2023.*

Tra le diverse categorie di detriti plastici, le microplastiche e le nanoplastiche hanno suscitato un crescente interesse scientifico a causa della loro ampia diffusione nell'ambiente e delle potenziali interazioni con gli organismi viventi [21].

In base alla loro origine, le microplastiche possono essere distinte in primarie e secondarie. Le microplastiche primarie sono prodotte intenzionalmente in dimensioni microscopiche per specifiche applicazioni commerciali e industriali, mentre le microplastiche secondarie derivano dalla frammentazione di materiali plastici più grandi, in seguito a processi di degradazione ambientale. Le microplastiche possono inoltre presentare una morfologia molto eterogenea e comprendere fibre, frammenti, pellet, perline, film e schiume. Le loro caratteristiche possono influenzarne il destino e il trasporto nell'ambiente, ma anche le interazioni con altre sostanze e con gli organismi viventi, contribuendo a determinarne le potenziali conseguenze biologiche [20, 21].

Le microplastiche sono state rilevate in tutti i compartimenti ambientali, tra cui ecosistemi marini e di acqua dolce, suoli e atmosfera, evidenziandone la distribuzione praticamente ubiquitaria. La loro presenza è stata documentata anche in regioni remote, come l'Artico e gli ambienti montani ad alta quota, a dimostrazione della capacità di queste particelle di essere trasportate anche a notevoli distanze. Sono state ritrovate anche in numerosi prodotti alimentari, indicando la possibilità di un trasferimento dall'ambiente alla catena alimentare. La loro ampia diffusione nell'ambiente e il possibile trasferimento attraverso la catena alimentare hanno quindi sollevato crescenti preoccupazioni riguardo i potenziali effetti sulla salute degli ecosistemi e degli organismi viventi [20].

Le microplastiche possono andare incontro ad ulteriori processi di degradazione e frammentazione, dando origine a particelle di dimensioni nanometriche: le nanoplastiche, le quali possono essere generate anche direttamente durante alcuni processi produttivi [22]. La definizione di nanoplastica è tuttora oggetto di discussione nella comunità scientifica, non esistendo ancora una definizione universalmente accettata. Infatti, al di là della classificazione dimensionale adottata dallo standard ISO 24187:2023, in letteratura sono state proposte diverse definizioni in base all'intervallo dimensionale considerato. Una delle definizioni più utilizzate considera le nanoplastiche come particelle prodotte involontariamente dalla degradazione e fabbricazione di oggetti in plastica, caratterizzate da un comportamento colloidale e da dimensioni comprese tra 1 e 1000 nm; altre definizioni propongono invece un intervallo dimensionale più ristretto, compreso tra 1 e 100 nm. Tuttavia, non è stato ancora raggiunto un consenso sul limite superiore delle dimensioni né sulle proprietà fisico-chimiche che permettono di definire una particella come nanoplastica. Di conseguenza, questa variabilità rende difficile il confronto tra gli studi e la caratterizzazione di queste particelle [23].

Nonostante l'assenza di una definizione universale, le dimensioni estremamente ridotte e le peculiari proprietà fisico-chimiche delle nanoplastiche ne favoriscono l'interazione con i sistemi biologici, rendendole di particolare interesse per la valutazione dei loro potenziali effetti sugli organismi viventi [23].

2.3 Caratteristiche delle nanoplastiche e loro potenziale impatto biologico

Le nanoplastiche costituiscono una categoria estremamente eterogenea di particelle, le cui proprietà fisico-chimiche possono variare considerevolmente in funzione di diversi fattori, tra cui dimensione, forma, composizione polimerica, presenza di additivi e caratteristiche della superficie [22, 24]. Esse possono infatti essere costituite da differenti tipologie di polimeri, tra cui polietilene, polipropilene e polistirene, e contenere diversi additivi, contribuendo così a sostanziali differenze nelle loro proprietà. Anche le caratteristiche della superficie possono variare: le nanoplastiche possono presentare diversi gruppi funzionali o adsorbire sostanze e inquinanti presenti nell'ambiente circostante, rendendone ulteriormente complessa la caratterizzazione [25]. Inoltre, rispetto alle microplastiche, le nanoplastiche presentano un elevato rapporto superficie/volume, che rende le proprietà superficiali molto rilevanti nel determinarne il comportamento e le interazioni con il mezzo circostante [26].
A causa delle loro ridotte dimensioni, le nanoplastiche possono presentare un comportamento colloidale, per cui il loro comportamento e le modalità con cui interagiscono con i sistemi biologici non dipendono solo dalle dimensioni, ma dipendono anche dalla composizione, dalla carica e dalle proprietà superficiali, nonché dalle interazioni che instaurano con l'ambiente circostante [26, 27].

Le proprietà superficiali assumono una grande importanza nell'interazione tra le nanoplastiche e i sistemi biologici: quando entrano in contatto con i fluidi biologici, le nanoplastiche possono interagire con le biomolecole presenti nel mezzo formando con esse dei complessi. Quando le proteine partecipano alla formazione di questi complessi, si forma una corona proteica sulla superficie della particella. La presenza di questo strato superficiale può modificare significativamente le proprietà superficiali della nanoplastica e, di conseguenza, la sua "identità biologica", influenzandone le successive interazioni biologiche [27]. La formazione e la composizione della corona sono a loro volta influenzate dalle proprietà fisico-chimiche delle nanoplastiche, in particolare dalle dimensioni, dall'idrofilia e dalla carica superficiale, oltre che dalle caratteristiche del mezzo biologico con cui esse entrano in contatto. Di conseguenza, la presenza della corona può contribuire

a determinare il modo in cui la particella viene riconosciuta dal sistema biologico, influenzandone il riconoscimento immunitario [23] (***Fig. 6***).

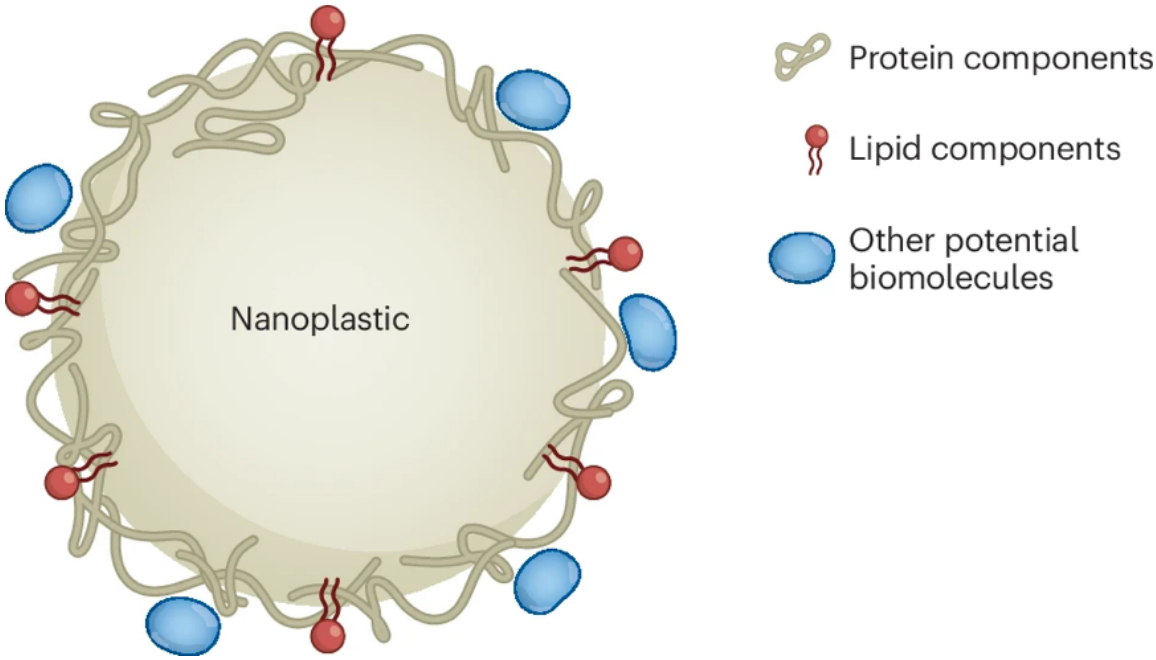


Figura 6. *La corona biomolecolare delle nanoplastiche. Immagine tratta Di Fiore C et al, 2026 [23].*

L'esposizione alle nanoplastiche può avvenire attraverso diverse vie, principalmente per ingestione, inalazione e contatto cutaneo. L'entità dell'esposizione da parte dell'organismo dipende non solo dalle caratteristiche e dal comportamento delle particelle, ma anche dalle concentrazioni presenti nell'ambiente. Le diverse vie di esposizione possono inoltre differire sia per il potenziale di assorbimento che per le conseguenze fisiologiche associate. Studi di laboratorio forniscono prove chiare che le nanoplastiche possono attraversare diverse barriere biologiche e penetrare nei tessuti, evidenziando quindi una possibile distribuzione all'interno dell'organismo [24].

Una volta raggiunti i tessuti, le loro ridotte dimensioni possono favorirne l'ingresso nelle cellule, che può avvenire attraverso diversi meccanismi di endocitosi, tra cui l'endocitosi mediata da clatrina, l'endocitosi mediata da caveolina e la macropinocitosi. La loro interazione con le strutture cellulari può interferire con diversi processi biologici e contribuire ad alterazioni della normale funzionalità cellulare. Tra gli effetti maggiormente osservati in seguito all'esposizione alle nanoplastiche sono stati descritti: stress ossidativo,

risposta infiammatoria, alterazioni della funzione mitocondriale e danno al DNA. Nel complesso, tali alterazioni possono compromettere l'omeostasi cellulare e contribuire agli effetti tossici associati all'esposizione alle nanoplastiche [22, 24].

3. Effetti delle plastiche sulla riproduzione femminile

3.1 Esposizione e distribuzione nell'apparato riproduttivo femminile

Come precedentemente descritto, una parte delle micro- e nanoplastiche (MNP, *Micro- and Nanoplastics*) introdotte nell'organismo può attraversare le barriere biologiche e distribuirsi nell'organismo, sebbene i meccanismi responsabili della loro traslocazione siano ancora poco compresi. Negli ultimi anni sono state rilevate queste particelle in diversi tessuti e fluidi biologici, il che ha suscitato un crescente interesse verso la possibilità che esse possano raggiungere anche l'apparato riproduttivo femminile [28].

Le evidenze attualmente disponibili indicano che le MNP possono raggiungere diversi compartimenti dell'apparato riproduttivo femminile e tessuti associati alla gravidanza. Nell'essere umano, è stata documentata la presenza di diversi polimeri nell'endometrio, nel liquido follicolare, nella placenta e nel liquido amniotico [29]. Questi rilevamenti suggeriscono che la distribuzione delle MNP possa interessare anche i tessuti riproduttivi e il microambiente che circonda l'oocita [28, 29]. Tuttavia, sebbene siano numerosi gli studi che hanno riscontrato la presenza di MNP in tessuti riproduttivi chiave, non è ancora chiaro quali siano i livelli di esposizione e come questi possano variare in base a regioni, stili di vita, sesso, età o trattamenti a cui sono sottoposti gli individui [28].

È stato dimostrato che in seguito all'ingestione di particelle di polistirene sono state ritrovate nanoparticelle della stessa composizione nei tessuti ovarici. Tale esposizione interferisce con lo sviluppo follicolare riducendo il numero di follicoli in crescita e maturi, e aumentando i follicoli atresici [30]. La presenza di particelle plastiche nel compartimento ovarico è stata successivamente osservata anche nell'essere umano, attraverso la loro identificazione nel liquido follicolare di donne sottoposte a tecniche di riproduzione assistita [28, 30]. Queste evidenze indicano quindi che l'esposizione alle MNP può interessare il microambiente nel quale si sviluppano il follicolo e l'oocita, influenzando la riserva ovarica e la fertilità femminile [29, 30]. Non è però stato ancora chiarito attraverso quali vie le particelle raggiungano il tessuto ovarico, né quali caratteristiche ne influenzino la traslocazione e la permanenza in questi compartimenti [30].

La presenza di plastiche è stata documentata anche a livello uterino: diversi tipi di polimeri, come polistirene e poliammide, sono stati ritrovati nell'endometrio, indicando che la distribuzione delle MNP può interessare anche i tessuti che costituiscono la cavità uterina. Tuttavia, le evidenze disponibili non consentono ancora di stabilire se la loro presenza sia transitoria oppure se si accumulano nel tessuto [28].

Sono state identificate MNP anche nei tessuti e nei fluidi associati alla gravidanza. Differenti polimeri, tra cui politetrafluoroetilene, polistirene e acrilonitrile-butadiene-stirene, sono stati ritrovati nella placenta e nel liquido amniotico [28, 29]. La presenza delle particelle in questi compartimenti suggerisce che la loro distribuzione possa estendersi fino all'interfaccia materno-fetale. Non sono però state trovate associazioni tra le MNP rilevate nella placenta e alterazioni dei parametri materni o neonatali, né sono stati segnalati esiti avversi della gravidanza in relazione alla loro presenza nel liquido amniotico [28].

Nel complesso, il rilevamento delle MNP in diversi tessuti e fluidi dell'apparato riproduttivo femminile indica che queste particelle possono raggiungere compartimenti essenziali per la riproduzione, suscitando un crescente interesse verso i loro possibili effetti sulla fertilità femminile [28, 30].

3.2 Meccanismi coinvolti nella tossicità riproduttiva

La tossicità associata alle MNP non sembra dipendere da un unico meccanismo d'azione, ma è probabilmente il risultato di molteplici fattori. Oltre agli effetti intrinseci delle particelle, possono aggiungersi anche gli effetti esercitati dagli additivi chimici presenti nei materiali plastici, alcuni dei quali possiedono proprietà pericolose note, tra cui alterazione endocrina e tossicità riproduttiva; a causa di quest'ultima c'è la possibilità che questi inquinanti vengano trasmessi alla generazione successiva portando a danni riproduttivi. La complessità di tali interazioni rende difficile definire un chiaro meccanismo d'azione; tuttavia, ci sono diverse evidenze sperimentali che indicano alcuni dei principali processi coinvolti quali: stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, infiammazione e apoptosi [28] (***Fig. 7***).

Tra i meccanismi maggiormente implicati nella tossicità ovarica delle MNP rientra lo stress ossidativo. Quando le particelle entrano nelle cellule possono favorire la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) e quando la loro quantità supera la capacità delle difese antiossidanti cellulari di neutralizzarli, si instaura una condizione di stress ossidativo. Nei modelli murini, l'esposizione alle MNP ha

determinato un aumento dei ROS nei tessuti ovarici, negli oociti e negli embrioni, accompagnato da alterazioni delle difese antiossidanti [28, 29]. In particolare, sono state osservate variazioni nell'attività di enzimi antiossidanti e un aumento della perossidazione lipidica, indicativi dell'instaurarsi di una condizione di stress ossidativo [29].
Gli effetti sulle difese antiossidanti sembrano dipendere dalla dose e dalla durata dell'esposizione alle MNP: a basse dosi è stato osservato un aumento compensatorio dell'attività antiossidante, mentre esposizioni più prolungate possono ridurre queste difese e aggravare lo stress ossidativo, favorendo l'accumulo di danni cellulari. Lo stress ossidativo può infatti alterare lipidi, proteine e DNA e compromettere la funzione mitocondriale, contribuendo all'attivazione dell'infiammazione e dell'apoptosi [29].

Una delle principali conseguenze dello stress ossidativo è l'attivazione dell'apoptosi, un processo di morte cellulare programmata coinvolto nel mantenimento dell'omeostasi tissutale. L'esposizione alle MNP è stata associata ad un aumento dell'apoptosi nel tessuto ovarico e, in particolare, nelle cellule della granulosa [28, 29]. Uno dei meccanismi maggiormente coinvolti è quello della via mitocondriale, regolata dall'equilibrio tra proteine pro-apoptotiche, come BAX (*Bcl-2-Associated X Protein*), e anti-apoptotiche, come BCL-2 (*B-Cell Lymphoma 2*). In seguito all'esposizione alle MNP è stato osservato un aumento del rapporto BAX/BCL-2, associato al rilascio del citocromo C da parte dei mitocondri e alla successiva attivazione delle caspasi 9 e 3, coinvolte nell'esecuzione del processo apoptotico [29].

Lo stress ossidativo è inoltre strettamente collegato alla risposta infiammatoria. L'esposizione alle MNP provoca infatti un aumento delle citochine proinfiammatorie nei tessuti ovarici e uterini. L'accumulo di ROS può favorire l'attivazione di NF-κB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) e dell'inflammasoma NLRP3 (*NOD-like receptor protein 3*), coinvolti nella produzione dei mediatori dell'infiammazione; quest'ultima determina anche l'attivazione della caspasi 1, favorendo la piroptosi nelle cellule della granulosa, una forma di morte cellulare programmata associata a una risposta infiammatoria. La perdita di queste cellule può compromettere la crescita e la sopravvivenza del follicolo, favorendone l'atresia e riducendo il supporto necessario per la maturazione dell'oocita. Sebbene in alcuni studi non sia stata osservata un'apoptosi evidente negli oociti, la morte delle cellule della granulosa potrebbe contribuire indirettamente alla riduzione della qualità ovocitaria e della riserva ovarica associata all'esposizione alle MNP [29].

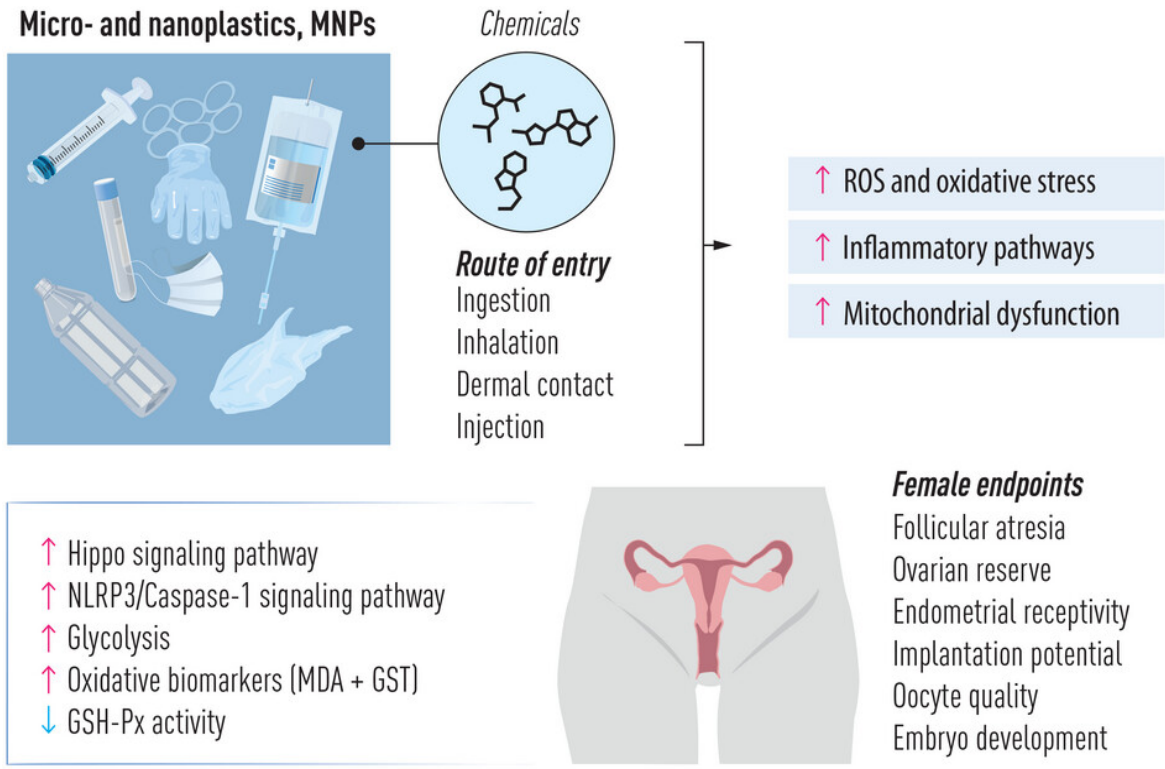


***Figura** 7. Meccanismi coinvolti nella tossicità riproduttiva femminile delle micro- e nanoplastiche (MNPs). Immagine tratta da Wehrli L et al, 2025 [28].*

3.3 Effetti ovarici delle MNP: alterazioni follicolari e ovocitarie

L'accumulo delle MNP nel tessuto ovarico può determinare alterazioni strutturali e funzionali dell'ovaio. A livello istologico sono stati osservati diversi gradi di edema tissutale, vacuolizzazione cellulare e, in alcuni casi, un aumento della fibrosi ovarica [29, 31]. Queste modificazioni si accompagnano ad alterazioni della popolazione follicolare, caratterizzate da una riduzione del numero e delle dimensioni dei follicoli in via di sviluppo, dalla diminuzione dei follicoli antrali e dei corpi lutei, e da un aumento dei follicoli atresici [29].

Anche la struttura dei follicoli può risultare compromessa, con un assottigliamento dello strato delle cellule della granulosa e una riduzione del loro numero. Tra le componenti cellulari del follicolo, queste cellule rappresentano uno dei principali bersagli della tossicità indotta dalle MNP. La loro esposizione alle particelle è stata associata all'attivazione di processi apoptotici e piroptotici che, determinando una progressiva perdita delle cellule, possono compromettere la crescita follicolare e favorire l'atresia. Questo può inoltre contribuire alla riduzione della riserva ovarica e alterare la produzione dei fattori necessari

al mantenimento del microambiente follicolare [29]. Poiché queste cellule svolgono un ruolo essenziale nel sostenere la crescita e la maturazione dell'oocita, la loro alterazione non solo può compromettere il microambiente follicolare, ma può anche interferire con la normale progressione della follicologenesi. Le modificazioni osservate a livello ovarico sono state inoltre associate ad alterazioni del ciclo riproduttivo nei topi, con un prolungamento delle fasi successive all'ovulazione e una riduzione della fase periovulatoria, indicando una possibile compromissione della funzione endocrina dell'ovaio [31].

Per quanto riguarda le alterazioni della funzione endocrina, sono state osservate variazioni delle concentrazioni degli ormoni sessuali, tra cui una riduzione dell'estradiolo e del progesterone e un aumento di FSH e LH. La diminuzione dell'estradiolo può riflettere la compromissione delle cellule della granulosa, che partecipano alla sua produzione e contribuiscono alla regolazione dello sviluppo follicolare. Quindi, anche queste alterazioni interferiscono con la maturazione dei follicoli [32].

Le conseguenze della disfunzione delle cellule della granulosa non rimangono tuttavia circoscritte al follicolo. Lo stress ossidativo e l'apoptosi di queste cellule possono contribuire ai disturbi della maturazione degli oociti e alla riduzione della loro qualità. In particolare, le cellule del cumulo, che derivano dalla differenziazione delle cellule della granulosa, sono necessarie per il nutrimento dell'oocita durante le fasi finali del suo sviluppo [29].

A livello ovocitario è stata quindi osservata un'alterazione della maturazione degli oociti. In particolare, sono state riscontrate una distruzione della struttura del fuso meiotico e dell'assemblaggio dell'actina, con conseguente compromissione della maturazione meiotica. Inoltre, l'esposizione alle MNP diminuisce il tasso di estrusione del primo globulo polare, il livello di glutatione, uno dei protettori principali antiossidanti cellulari, del potenziale di membrana mitocondriale, indicatore della funzionalità dei mitocondri e del calcio presente nel reticolo endoplasmatico. Queste modificazioni, insieme all'aumento dei ROS, indicano una compromissione dei processi cellulari necessari alla normale maturazione dell'oocita. Tutte queste alterazioni sommate tra loro contribuiscono alla riduzione della qualità ovocitaria e possono ripercuotersi sulla capacità di fecondazione e sul successivo sviluppo embrionale [32].

3.4 Effetti sulla gravidanza, sviluppo embrio-fetale e progenie

La placenta rappresenta un'interfaccia fondamentale tra la madre e il feto, poiché regola gli scambi materno-fetali e contribuisce al mantenimento dell'ambiente necessario allo sviluppo embrionale. La prima evidenza della presenza di microplastiche nella placenta umana è stata fornita dallo studio condotto da Ragusa A. et al [33], nel quale diversi frammenti di microplastica sono stati trovati in campioni di placenta. Questo ha sollevato diversi interrogativi sulle possibili conseguenze dell'accumulo di queste particelle a livello dell'interfaccia materno-fetale, anche perché la presenza di plastiche in quest'organo potrebbe danneggiare la delicata risposta di riconoscimento tra self e non self, con una serie di conseguenze sullo sviluppo embrionale che devono ancora essere definite [33].

Nonostante si ritenga che soltanto una piccola percentuale delle MNP introdotte nell'organismo venga assorbita, le particelle di dimensioni inferiori a 10 μm sembrano essere in grado di penetrare nella placenta e, soprattutto nel caso delle nanoplastiche, di attraversare la barriera placentare raggiungendo i tessuti fetali, causando quindi tossicità nel feto. Le cellule embrionali sono molto vulnerabili all'azione di sostanze tossiche, poiché durante l'organogenesi queste sono sottoposte a processi finemente regolati di proliferazione, differenziamento, migrazione e apoptosi. L'alterazione di questi processi può compromettere il normale sviluppo degli organi e favorire la comparsa di conseguenze che possono manifestarsi anche dopo la nascita o in età adulta. In particolare, l'esposizione materna alle nanoplastiche in gravidanza può danneggiare il cervello fetale in via di sviluppo poiché, riuscendo queste ad attraversare la barriera placentare, possono causare neuroinfiammazione, stress ossidativo e interruzione delle vie di segnalazione cellulare, con possibili ripercussioni sullo sviluppo cerebrale e sulle funzioni cognitive e motorie della progenie [32] (***Fig. 8***).

I dati epidemiologici relativi all'esposizione materna a particelle fini e ultrafini hanno inoltre evidenziato associazioni con preeclampsia, parto prematuro, aborto spontaneo e natimortalità. Queste osservazioni rafforzano pertanto la necessità di approfondire le possibili conseguenze dell'esposizione alle MNP durante la gravidanza [32].

Le conseguenze dell'esposizione alle MNP potrebbero estendersi anche alle generazioni successive, sebbene le evidenze disponibili siano ancora limitate e contraddittorie. Attraverso studi transgenerazionali *in vivo* in modelli murini è stato osservato che l'esposizione materna alle microplastiche di polietilene ha determinato alterazioni riproduttive sia nelle madri che nella prole femminile, caratterizzate da una ridotta maturazione ovocitaria, tasso di fecondazione, sviluppo embrionale e fertilità

complessiva. Altri studi invece non hanno evidenziato effetti riproduttivi nelle femmine delle generazioni successive, oppure hanno osservato alterazioni limitate alla progenie maschile, suggerendo una possibile dipendenza degli effetti dal sesso, dalla specie e dalle caratteristiche dell'esposizione [28].

Le evidenze disponibili indicano quindi che l'esposizione alle MNP durante la gravidanza può determinare conseguenze sulla funzione placentare, sullo sviluppo embrio-fetale e sulla salute riproduttiva della progenie. Tuttavia, il numero limitato degli studi e l'eterogeneità dei risultati non consentono ancora di definire con certezza l'entità di tali effetti né di stabilire se possano estendersi alle generazioni non direttamente esposte [28, 32].

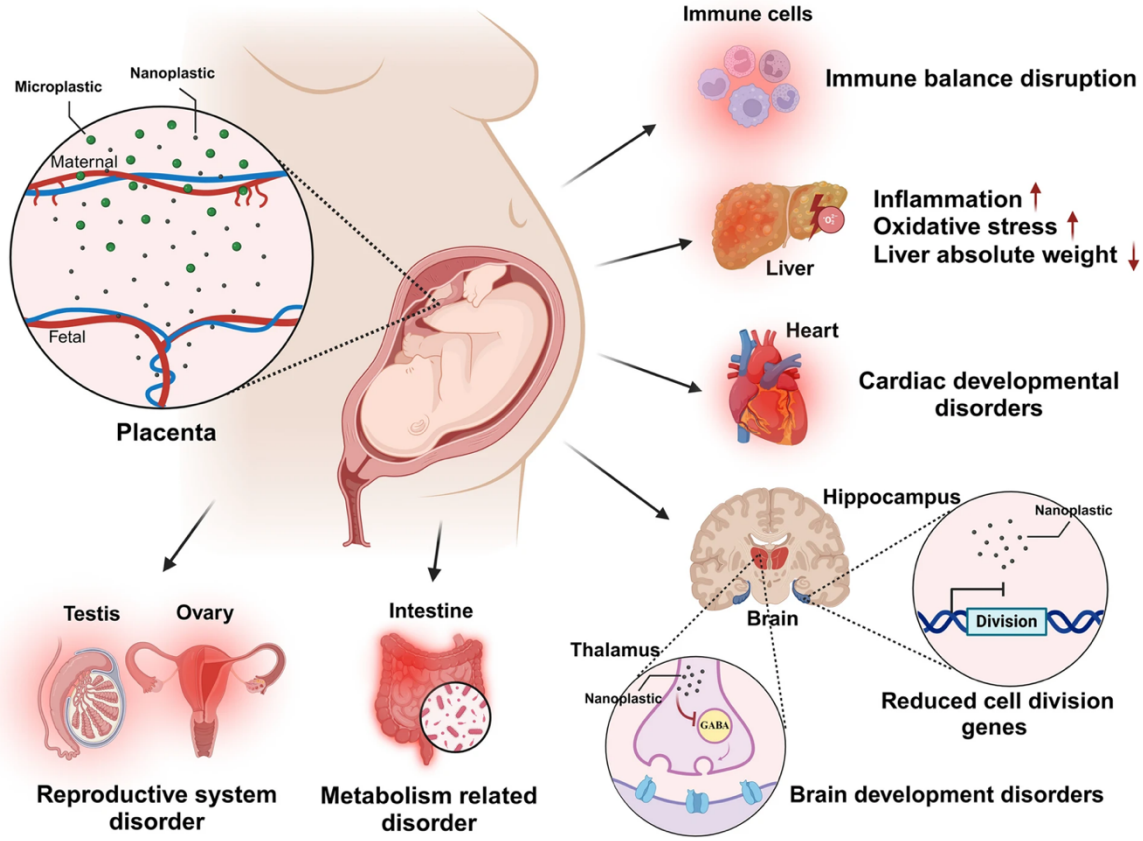


***Figura 8**. Possibili effetti dell'esposizione materna alle MNP sul feto e sulla progenie. Immagine tratta da Balali H et al, 2024 [32].*

SCOPO DEL LAVORO

Questo progetto di tesi ha come obiettivo la valutazione dei possibili effetti dell'esposizione a micro- e nanoplastiche sulla gametogenesi femminile.

In particolare, mediante l'analisi istologica delle ovaie di topoline di 2 mesi, sono stati confrontati animali trattati con dosi differenti di microplastiche di polistirene e animali di controllo non trattati, per individuare eventuali alterazioni della struttura ovarica e dello sviluppo follicolare.

Parallelamente, mediante esperimenti di maturazione *in vitro* condotti su oociti isolati da topoline adulte, sono stati valutati gli effetti dell'esposizione alle nanoplastiche sulla resa della maturazione ovocitaria; è inoltre stata analizzata la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), indicatore di stress ossidativo, confrontando gli oociti trattati con nanoplastiche e gli oociti di controllo, al fine di valutare l'eventuale insorgenza di stress ossidativo associata all'esposizione.

MATERIALI E METODI

Dichiarazione etica:

Tutte le procedure relative a questo lavoro sono state eseguite in seguito all'approvazione del Comitato Etico Italiano, in conformità con i principi guida europei EU (63/2010) e italiani (26/2014), sulla protezione degli animali utilizzati ai fini della ricerca scientifica. Per questo studio, sono state sacrificate femmine B6D2F1 (*Mus musculus domesticus*) adulte, all'età di circa 2 mesi, per l'isolamento degli oociti. Tutti i topi sono stati mantenuti in una stanza a temperatura e umidità controllata, ciclo luce/buio (12L - 12B) e alimentati *ad libitum*. Come da linee guida istituzionali, gli animali sono stati anestetizzati con Tiopentale sodico (30-40 mg/kg) per via intraperitoneale, previo sacrificio tramite dislocazione cervicale.

1. Preparazione dei campioni istologici

Disegno sperimentale e trattamento degli animali

Per la preparazione dei campioni destinati all'analisi istologica del tessuto ovarico sono state sacrificate 15 femmine B6D2F1, suddivise in tre gruppi, ciascuno costituito da cinque animali: un gruppo di controllo e due gruppi sperimentali, trattati rispettivamente con una dose media (1 mg/L) e una dose alta (10 mg/L) di microplastiche di polistirene. La sperimentazione ha avuto una durata complessiva di 35 giorni, in accordo con i dati presenti in letteratura.

L'esposizione è stata effettuata attraverso l'acqua di abbeveraggio, con l'aggiunta delle microplastiche di polistirene direttamente nei biberon, mentre il gruppo di controllo ha ricevuto acqua standard, priva di plastiche. L'acqua è stata sostituita una volta alla settimana e a ciascuna sostituzione è stata registrata la quantità residua presente nei biberon, al fine di stimare il consumo effettivo di acqua da parte degli animali. Contestualmente, gli animali sono stati anche pesati per monitorare eventuali variazioni del peso corporeo nel corso della sperimentazione.

Al termine dei 35 giorni, tutti gli animali sono stati sacrificati e le ovaie prelevate e destinate alle successive analisi istologiche.

1.1 Fissazione, inclusione e colorazione delle sezioni di ovario

Le ovaie isolate sono state trasferite in contenitori di vetro e fissate successivamente mediante immersione in una soluzione di paraformaldeide (PFA) al 4% per circa 5-6 ore. Questo passaggio consente di preservare la morfologia e l'organizzazione strutturale del tessuto, prevenendo i processi degradativi che possono instaurarsi una volta che il campione viene rimosso dal suo ambiente vitale.

Dopo la fissazione, sono stati effettuati due lavaggi brevi in acqua. In questo passaggio, la PFA viene rimossa gradualmente, prestando attenzione a non eliminare il campione e lasciandolo sempre in una piccola quantità di soluzione, in modo che non rimanga mai completamente a secco. Dopo la rimozione di parte della soluzione di PFA, viene quindi aggiunta una quantità minima di acqua mediante una pipetta Pasteur, così da rendere graduale il cambio del reagente ed evitare lo *shock* del campione. Il contenuto viene successivamente eliminato e sostituito con nuova acqua, assicurandosi che il campione rimanga sempre immerso. Questa procedura viene adottata a ogni sostituzione del reagente.

Dopo i lavaggi, i campioni sono stati disidratati mediante passaggi successivi in soluzioni di alcool a concentrazione crescente. Inizialmente le ovaie sono state mantenute in alcool all'80% per una notte, per un tempo minimo di 4-5 ore, e successivamente sono state trasferite in alcool al 95% per 2 ore. La disidratazione è stata infine completata mediante due passaggi consecutivi in alcool assoluto, per una durata complessiva minima di 4-5 ore e massima di 24 ore. Durante il primo passaggio i campioni sono stati mantenuti in alcool assoluto per 1-1.30 ore, mentre, il secondo passaggio è stato protratto per altre 3-4 ore. La disidratazione è fondamentale perché consente di rimuovere l'acqua presente nel campione, permettendo la successiva penetrazione del mezzo di inclusione all'interno del campione.

Al termine della disidratazione i campioni sono stati sottoposti a diafanizzazione mediante immersione in xilene per circa 15 minuti. Questo passaggio consente la sostituzione dell'alcool con un solvente miscibile con la paraffina (il mezzo di inclusione), preparando così i campioni alla successiva fase di inclusione. Il trattamento con xilene determina inoltre la schiaritura del tessuto.

Una volta completata la diafanizzazione, i campioni sono stati inclusi in paraffina, al fine di conferire loro la corretta consistenza per il successivo sezionamento. La procedura viene articolata in due fasi: una prima fase di infiltrazione, effettuata *overnight*, e una successiva fase di inclusione vera e propria.

Le ovaie sono quindi state trasferite all'interno di una stufa, in una vaschetta provvista di griglia e contenente paraffina liquida, e lasciate in infiltrazione per una notte, per un tempo minimo di 5-6 ore. Il giorno successivo, ciascun campione è stato trasferito in una vaschetta di metallo precedentemente riscaldata e contenente paraffina liquida; in questa fase il campione è stato posizionato correttamente mediante l'ausilio di una pinzetta riscaldata. Dopo il posizionamento del campione, la vaschetta è stata collocata su un piano di rame per favorire la solidificazione della paraffina e, subito dopo, è stato posizionato un ring di plastica sulla vaschetta, esercitando una pressione sufficiente a garantirne l'adesione. Infine, i blocchetti ottenuti sono stati lasciati solidificare a temperatura ambiente per almeno 4-5 ore.

I campioni inclusi in paraffina sono stati successivamente sezionati mediante microtomo, ottenendo sezioni dello spessore di circa 7 μm. Le sezioni, una volta tagliate, sono state trasferite in un bagno termostatato a 37˚C, al fine di favorirne la distensione ed eliminare eventuali raggrinzimenti formatesi durante il sezionamento. Le sezioni ben distese sono state quindi raccolte e disposte su vetrini portaoggetti e lasciati asciugare a 36-37˚C per due notti.

La procedura di preparazione dei vetrini è stata eseguita in collaborazione con la Prof.ssa Valeria Merico.

Una volta asciutti, i vetrini sono stati sottoposti a sparaffinatura, necessaria per rimuovere la paraffina e consentire la penetrazione dei reagenti acquosi all'interno del campione. La paraffina è stata rimossa mediante due passaggi consecutivi in xilolo, ciascuno dalla durata di 5 minuti. Le sezioni sono state poi reidratate mediante passaggi in soluzioni alcoliche a concentrazione decrescente: inizialmente i vetrini sono stati immersi in due vaschette contenenti alcool assoluto per 2-5 minuti ciascuna, poi in alcool al 96% per 3-5 minuti, e infine in alcool all'80% per altri 3-5 minuti. Al termine della reidratazione è stato effettuato un breve lavaggio in acqua, prima di procedere con la colorazione PAS-ematossilina.

Le sezioni sono state poi sottoposte a colorazione PAS-ematossilina. La reazione PAS (*Periodic Acid–Schiff*) si basa sull'ossidazione dei gruppi ossidrilici presenti nei carboidrati mediante l'acido periodico; questo provoca la formazione di gruppi aldeidici che reagiscono con il reattivo di Schiff, producendo una colorazione magenta. La successiva controcolorazione con ematossilina consente invece di evidenziare i nuclei in blu-violaceo.

Al termine della colorazione le sezioni sono state nuovamente disidratate mediante passaggi in soluzioni alcoliche a concentrazione crescente; in questo caso la durata è stata

ridotta a 30 secondi per ciascuna soluzione. Poi è stata effettuata anche la diafanizzazione mediante due passaggi consecutivi in xilolo, anch'essi della durata di 30 secondi ciascuno.

Mantenendo i vetrini ancora bagnati, è stata applicata una quantità abbondante di montante, sufficiente a ricoprire ciascuna sezione, ed è stato poi posizionato un vetrino coprioggetto sopra, esercitando una lieve pressione per favorirne l'adesione ed eliminare eventuali bolle d'aria. Infine, è stato eliminato il montante in eccesso e i preparati sono stati lasciati asciugare completamente, prima della successiva osservazione al microscopio ottico.

1.2 Analisi in microscopia ottica

Le sezioni ovariche colorate sono state successivamente osservate mediante microscopio ottico, al fine di valutarne le caratteristiche isto-morfologiche. In particolare, sono stati esaminati i follicoli ovarici nei diversi stadi di sviluppo ed è stata valutata la presenza di eventuali alterazioni morfologiche e quantitative, confrontando i gruppi esposti alla dose media e alta di microplastiche con il gruppo di controllo.

2. Maturazione *in vitro* degli oociti murini

Disegno sperimentale

Per questa sperimentazione sono state sacrificate 18 femmine B6D2F1 di circa 4-6 settimane. Le ovaie prelevate sono state utilizzate per l'isolamento degli oociti antrali allo stadio di vescicola germinale (GV), sottoposti successivamente a maturazione *in vitro*. Per ogni esperimento, gli oociti isolati sono stati suddivisi in due gruppi: un gruppo di controllo, mantenuto in terreno α-MEM, e un gruppo trattato mediante l'aggiunta di nanoplastiche del diametro di 0,025 μm, alla concentrazione di 100 μg/ml al terreno α-MEM. Al termine dell'incubazione, è stata valutata la maturazione allo stadio di metafase II (MII).

2.1 Isolamento delle ovaie

In seguito al sacrificio degli animali, le ovaie sono state asportate e depositate in una piastra Petri contenente 2 ml di PBST (*Phosphate-Buffered Saline with Tween-20*), una soluzione tampone. Questo passaggio è fondamentale per eliminare i contaminanti superficiali, come i residui lipidici. Successivamente, utilizzando una pinzetta sterile, le ovaie sono state trasferite in una seconda piastra Petri contenente 2 ml di terreno M2 (Millipore),

precedentemente riscaldato in incubatore a 37°C per ridurre lo stress cellulare e per preservare l'integrità degli oociti, mantenendoli in un ambiente termicamente ottimale per la loro vitalità.

2.2 Isolamento degli oociti

Le ovaie trasferite nel terreno M2, vengono perforate e frammentate con un ago sterile, al fine di liberare gli oociti in GV contenuti all'interno dei follicoli ovarici. Gli oociti vengono aspirati dal terreno mediante l'uso della pipetta a bocca, la quale consente di prelevarli attraverso movimenti di aspirazione delicati e controllati.

Tutti gli oociti isolati sono stati successivamente collocati in una terza piastra Petri, contenente gocce di terreno M2 ricoperte da uno strato di olio minerale (Sigma Aldrich), per garantire la loro stabilità e prevenire l'evaporazione.

2.3 Maturazione *in vitro*

Prima dell'isolamento degli oociti sono state preparate due piastre Petri destinate alla maturazione *in vitro*: una destinata al gruppo di controllo contenente gocce di α-MEM, e l'altra destinata al gruppo trattato contenente gocce di α-MEM addizionato con nanoplastiche. Tutte le gocce sono state ricoperte con olio minerale e le piastre sono state mantenute in incubatore fino al momento dell'utilizzo.

Al termine dell'isolamento, gli oociti sono stati depositati nelle gocce destinate alla maturazione e le Petri mantenute in incubatore per circa 12 ore a 37°C.

2.4 Valutazione della maturazione ovocitaria

Le rese di maturazione sono state valutate mediante l'osservazione degli oociti, i quali vengono classificati in quattro categorie in base alle loro caratteristiche morfologiche: oociti che hanno raggiunto lo stadio di MII, oociti rimasti allo stadio di GV, oociti arrestati durante la maturazione e oociti aberranti o morti.

3. Analisi mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Principio della tecnica

La microscopia elettronica a trasmissione utilizza come sorgente luminosa un fascio di elettroni che attraversa sezioni sottili del campione e consente di osservare ad alta

risoluzione la struttura interna delle cellule. Questo tipo di microscopia, grazie alla collaborazione con il gruppo del prof. Biggiogera del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, è stata utilizzata per valutare l'internalizzazione e la localizzazione delle nanoplastiche negli oociti.

3.1 Fotoconversione e visualizzazione

Dopo la fissazione in glutaraldeide al 2% in PBS per 2 ore a 4 °C e il successivo lavaggio *overnight* in PBST, gli oociti in MII sono stati sottoposti alla procedura di fotoconversione. I campioni sono stati posti in una soluzione di 3,3′-diaminobenzidina (DAB) e irradiati con luce UV su ghiaccio per 2 ore. In queste condizioni, la luce UV eccita il fluorocromo associato alle nanoplastiche ed emette un fotone che ossida la DAB, provocandone la precipitazione e rendendola insolubile, consentendo quindi la rilevazione mediante TEM.
Gli oociti che hanno acquisito una colorazione scura sono stati successivamente risciacquati e immersi nel tetrossido di osmio (OsO_4) all'1% per 2 ore a temperatura ambiente. Successivamente sono stati pre-incorporati in agar al 2%, disidratati in acetone, inclusi in Epon e polimerizzati a 60˚C.

Sono state ottenute sezioni semisottili dello spessore di 500 nm tramite l'ultramicrotomo, e raccolte su griglie di rame rivestite con formvar. I campioni non sono stati colorati, poiché i precipitati di uranile e piombo avrebbero potuto interferire con il rilevamento del precipitato di DAB-osmio.
Le griglie sono infine state osservate con un microscopio elettronico a trasmissione JEOL JEM-1200EXIII dotato di telecamera CCD TEM Mega View III e le microfotografie sono state successivamente montate utilizzando il software Fiji (ImageJ) per ricostruire l'oocita [34].

4. Valutazione dei livelli intracellulari di ROS

Principio della tecnica

La produzione di specie reattive dell'ossigeno negli oociti è stata valutata mediante la sonda DCFH-DA (*2',7'-diclorodiidrofluoresceina diacetato*), una forma ridotta e acetilata della fluoresceina, non fluorescente e permeabile alla membrana cellulare. Una volta penetrata nella cellula, i gruppi acetato vengono rimossi da esterasi intracellulari, formando una molecola carica che viene trattenuta all'interno della cellula; la successiva ossidazione della

sonda determina la formazione del composto fluorescente DCF. L'aumento della fluorescenza emessa dalla DCF consente quindi di rilevare la presenza di ROS negli oociti.

4.1 Marcatura degli oociti con DCFH-DA

La sonda DCFH-DA è stata diluita in PBST, fino ad ottenere una soluzione alla concentrazione finale di 10 µM (nello specifico, 1 µl di sonda è stato aggiunto a 999 µl di PBST). La soluzione è stata poi mantenuta al buio fino al momento dell'utilizzo.
Al termine della maturazione *overnight*, gli oociti in MII sono stati prelevati dal terreno di coltura e sottoposti ad un lavaggio in PBST. Successivamente sono stati trasferiti in una goccia della soluzione della sonda, ricoperta sempre con olio minerale, e incubati per 30 minuti a 37˚C. Al termine dell'incubazione sono stati eseguiti due lavaggi in PBST.

4.2 Analisi in microscopia confocale

Gli oociti sono stati successivamente trasferiti in una piastra Petri con fondo di vetro, per l'osservazione con il microscopio confocale Olympus Fluoview Fv10i. Per visualizzare il nucleo, le cellule sono state colorate con il marcatore DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) diluito in PBST; il DAPI si lega specificamente alle regioni A-T del DNA.
Il segnale fluorescente derivante dalla sonda DCFH-DA è stato osservato nel canale FITC. L'intensità del segnale è stata infine utilizzata per confrontare la presenza di ROS tra gli oociti del gruppo di controllo e quelli esposti alle nanoplastiche.

RISULTATI

I risultati ottenuti in questo studio derivano da due approcci sperimentali complementari condotti *in vivo* e *in vitro*, con i quali è stato possibile indagare gli effetti dell'esposizione a micro- e nanoplastiche sulla gametogenesi femminile.

Lo studio *in vivo* ha previsto un'analisi isto-morfologica delle ovaie, finalizzata ad individuare possibili alterazioni della morfologia ovarica e della follicologenesi. Questa valutazione ha incluso sia l'analisi qualitativa delle caratteristiche del tessuto ovarico, sia l'analisi quantitativa del numero di follicoli durante le diverse fasi di maturazione. A tale scopo, sono state confrontate topoline adulte esposte a due diverse concentrazioni di microplastiche di polistirene (1 mg/L e 10 mg/L) con topoline di controllo.

Parallelamente, nello studio *in vitro* è stata condotta un'analisi quantitativa della maturazione degli oociti antrali in GV, valutando gli effetti dell'esposizione alle nanoplastiche di polistirene. La resa della maturazione è stata espressa come percentuale di oociti che hanno raggiunto lo stadio di MII, ed è stata confrontata tra il gruppo trattato e il gruppo di controllo. Sugli stessi oociti è stata inoltre effettuata un'analisi qualitativa e semi-quantitativa dell'intensità di fluorescenza associata alla sonda DCFH-DA, utilizzata come indicatore di ROS, confrontando gli oociti trattati con quelli di controllo. Infine, attraverso la TEM, è stata effettuata anche un'analisi qualitativa dell'internalizzazione e della localizzazione delle nanoplastiche negli oociti.

1. Analisi *in vivo* degli effetti delle microplastiche

1.1 Parametri relativi all'esposizione

Durante i 35 giorni di sperimentazione è stato monitorato settimanalmente il peso corporeo delle topoline appartenenti ai tre gruppi sperimentali (5 animali per gruppo): gruppo di controllo, gruppo trattato con una dose media di microplastiche di polistirene (1 mg/L) e gruppo trattato con una dose alta (10 mg/L). I valori del peso registrati settimanalmente per gli animali impiegati nella sperimentazione, sono stati successivamente utilizzati per calcolare il peso corporeo medio settimanale per ciascun gruppo.

Come riportato nella **Tabella 1**, i valori sono stati considerati a partire dalla settimana 0, corrispondente all'inizio della sperimentazione, fino alla settimana 5, coincidente con il giorno del sacrificio. L'andamento temporale (per i 35 giorni di sperimentazione) è stato valutato mediante analisi di regressione lineare per ciascun gruppo. In tutti i gruppi è stato osservato un incremento significativo del peso corporeo nel corso

del periodo di osservazione, con pendenze stimate pari a 0,48, 0,56 e 0,52 g/settimana rispettivamente nel gruppo di controllo, nel gruppo trattato con 1 mg/L e nel gruppo trattato con 10 mg/L. Le pendenze sono risultate comparabili tra i gruppi, suggerendo che il trattamento non abbia influenzato in maniera rilevante la velocità di incremento del peso corporeo durante il periodo di osservazione (**Grafico 1**).

Settimana	**Controllo (g)**	**Dose media – 1 mg/L (g)**	**Dose alta – 10 mg/L (g)**
0	17,4	18,8	18,0
1	18,4	20,2	18,8
2	18,6	20,6	18,6
3	19,2	20,6	18,6
4	19,8	21,4	20,2
5	19,8	22,0	20,8
Incremento medio	**+2,4 g**	**+3,2 g**	**+2,8 g**

Tabella 1. *Andamento settimanale del peso corporeo medio delle topoline nei gruppi di controllo, dose media e dose alta durante le cinque settimane di sperimentazione (n = 5 animali per gruppo). È riportato anche l'incremento medio, calcolato come differenza tra il peso corporeo medio alla settimana 5 e quello alla settimana 0, pari a 2,4 g nel controllo, 3,2 g nella dose media e 2,8 g nella dose alta.*

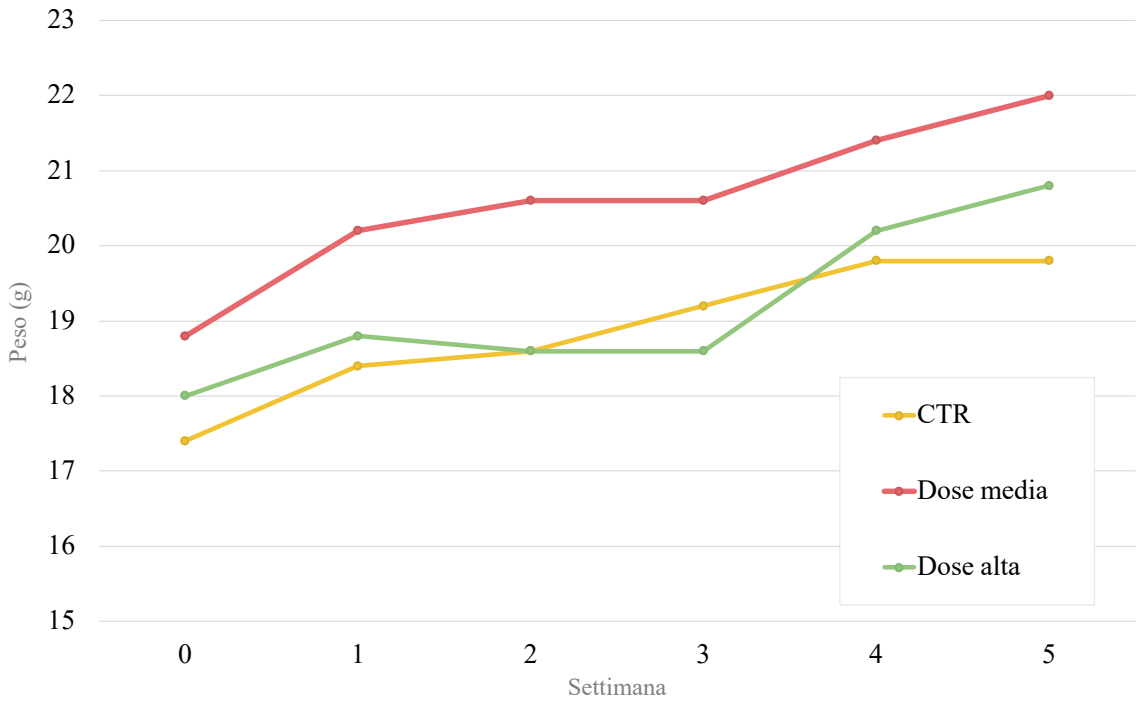


***Grafico 1**. Andamento del peso corporeo nel corso delle 5 settimane di osservazione nei gruppi di controllo e trattati con 1 mg/L (dose media) e 10 mg/ (dose alta) di microplastiche.*

Parallelamente alla misurazione del peso corporeo medio, è stata calcolata anche la dose settimanale di microplastiche assunta, tenendo conto della concentrazione di microplastiche presente nell'acqua, del consumo di acqua e del peso corporeo medio.
Come riportato nella **Tabella 2** e come facilmente desumibile la dose settimanale di microplastiche assunta è risultata maggiore nel gruppo esposto a 10 mg/L rispetto al gruppo esposto a 1 mg/L per tutta la durata del trattamento, pur mostrando variazioni nel corso delle settimane in relazione al consumo di acqua e al peso degli animali. Considerando l'intero periodo sperimentale, la dose media giornaliera assunta dalle topoline è risultata pari a 0,306 mg/kg/giorno nel gruppo a dose media e a 2,992 mg/kg/giorno nel gruppo a dose alta.

Settimana	Controllo (mg/kg/settimana)	Dose media – 1 mg/L (mg/kg/settimana)	Dose alta – 10 mg/L (mg/kg/settimana)
1	0	2,475	26,596
2	0	2,427	26,882
3	0	2,427	16,129
4	0	1,776	17,822
5	0	1,591	17,308
Dose cumulativa	**0 mg/kg**	**10,696 mg/kg**	**104,736 mg/kg**

Tabella 2*. Dose settimanale di microplastiche di polistirene assunta dai gruppi esposti alla concentrazione media e alta durante i 35 giorni di trattamento.*

1.2 Analisi morfo-istologica dell'ovaio

L'analisi qualitativa morfo-istologica delle sezioni ovariche ha permesso di valutare l'organizzazione generale del tessuto ovarico e la presenza dei follicoli nei diversi stadi dello sviluppo. In particolare, sono stati considerati la morfologia e le dimensioni complessive dell'ovaio, la distribuzione e la classificazione dei follicoli, le cellule follicolari in divisione e la presenza di follicoli in atresia. Il confronto tra i tre gruppi sperimentali ha evidenziato una certa variabilità tra i singoli campioni, accompagnata da differenze più marcate nelle topoline esposte alla dose alta di microplastiche di polistirene (***Fig. 9***).

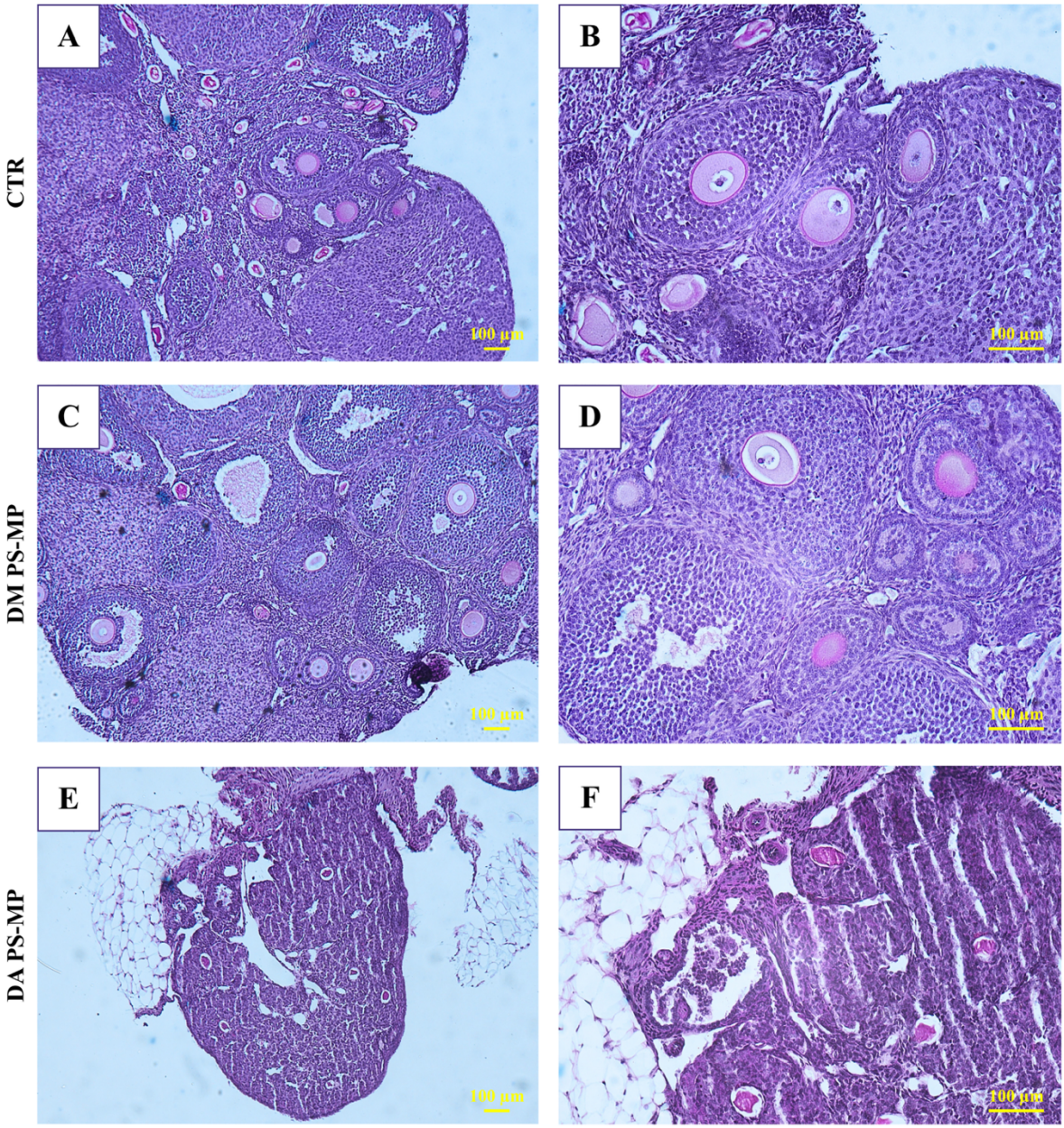


Figura 9. *Panoramica delle sezioni ovariche dei tre gruppi sperimentali colorate con PAS-ematossilina in cui si osserva l'organizzazione del tessuto e la presenza dei follicoli nei diversi stadi di sviluppo. In A e in B sono rappresentate le sezioni del gruppo di controllo. In C e D le sezioni del gruppo trattato con dose media di microplastiche di polistirene (1 mg/L). In E e F le sezioni del gruppo trattato con dose alta di microplastiche di polistirene (10 mg/L). Ingrandimento 5x per A, C ed E e 10x per B, D e F. Dimensione barra: 100 µm.*

Negli ovari appartenenti al gruppo di controllo (***Fig. 9 A e B***), la struttura generale del tessuto è risultata complessivamente conservata. Nel parenchima ovarico di alcuni campioni è stata osservata un'estesa vascolarizzazione e la presenza di una massa dall'aspetto fibroso in prossimità dell'ovidotto, caratterizzata da un'intensa colorazione rosa-magenta (***Fig. 10)***.

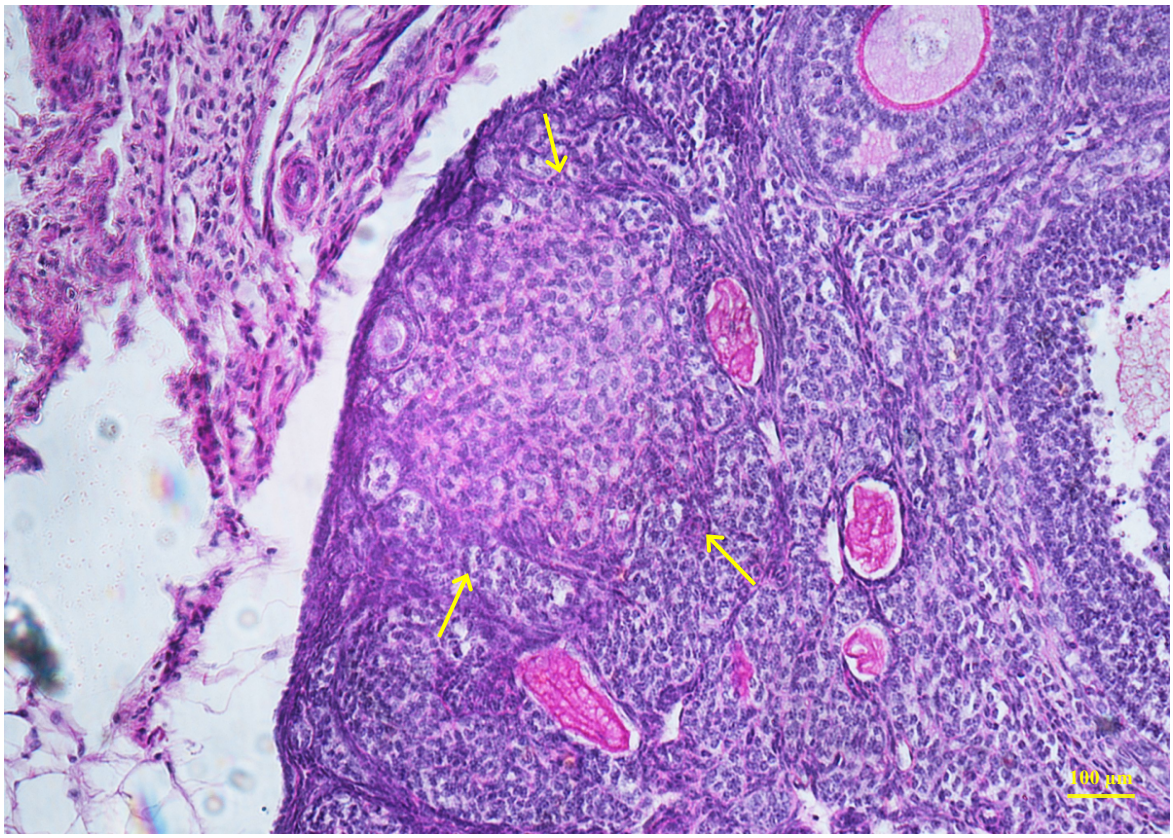


Figura 10. *Massa dall'aspetto fibroso in una sezione ovarica del gruppo di controllo colorata con PAS-ematossilina. Ingrandimento 10x. Dimensione barra: 100 µm.*

In questi ovari sono stati riconosciuti numerosi follicoli appartenenti ai diversi stadi dello sviluppo, dai follicoli primordiali, localizzati alla periferia della regione corticale, fino ai follicoli di dimensioni progressivamente maggiori. Il conteggio ha evidenziato una maggiore rappresentazione dei follicoli primordiali rispetto agli stadi follicolari successivi, come riportato nella **Tabella 3** e nel **Grafico 2**.

Stadio follicolare	Controllo	Dose media (1 mg/L)	Dose alta (10 mg/L)
Primordiale	250	234	35
Primario	58	62	18
Secondario	18	42	19
Pre-antrale	19	21	4
Antrale	9	2	2
In atresia	30	21	19
Totale follicoli	384	382	97

Tabella 3. *Numero complessivo di follicoli ovarici suddivisi per stadio di sviluppo nei tre gruppi sperimentali.*

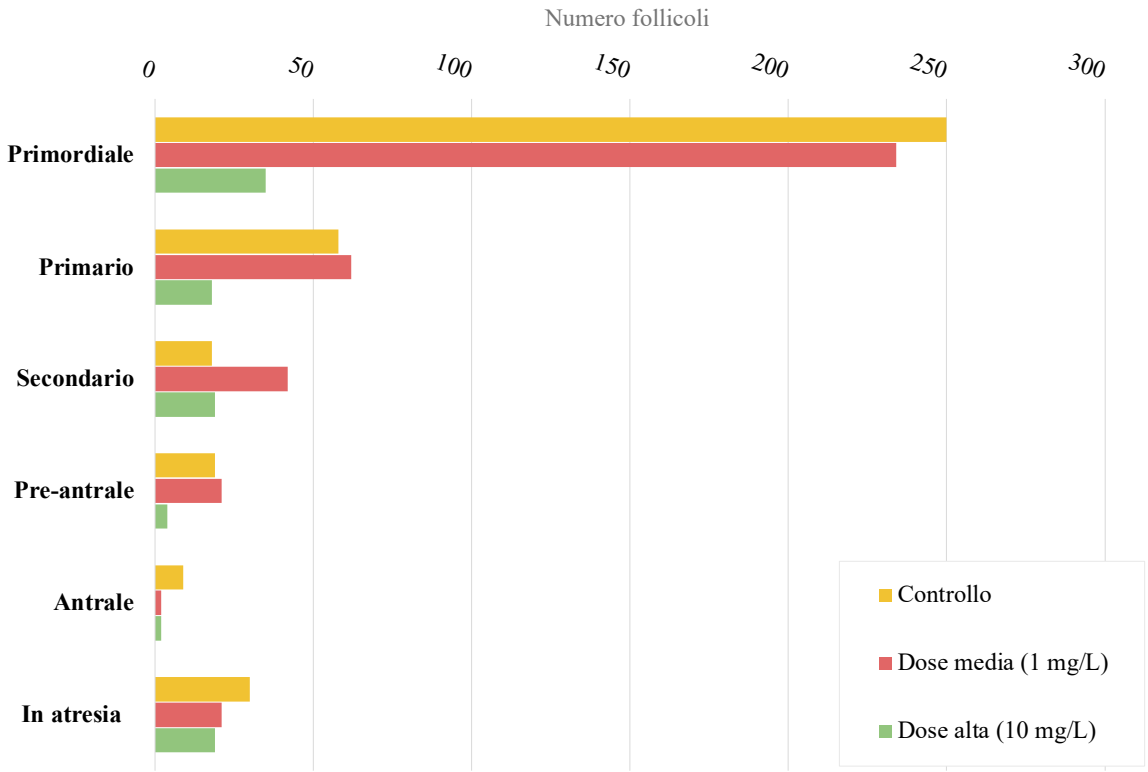


Grafico 2. *Distribuzione del numero complessivo di follicoli nei diversi stadi di sviluppo tra i gruppi di controllo (in giallo), dose media (in rosso) e dose alta (in verde).*

Sono inoltre state osservate le cellule della granulosa in divisione nei diversi stadi follicolari (***Fig. 11***). Nel gruppo di controllo, il conteggio più elevato è stato riscontrato nei follicoli pre-antrali, con 163 cellule in divisione come riportato nella **Tabella 4** e nel **Grafico 3**.

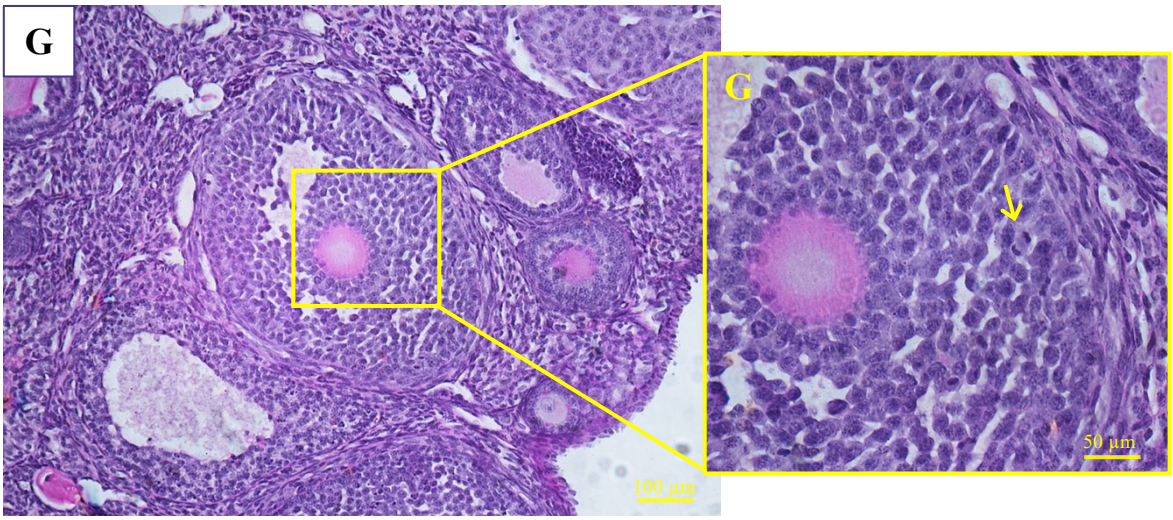


Figura 11. *Follicolo secondario in una sezione ovarica del gruppo di controllo colorata con PAS-ematossilina. In G' è mostrato un ingrandimento dell'area delimitata dal riquadro giallo; la freccia indica una cellula della granulosa in divisione. Ingrandimento 10x in G e 20x in G'. Dimensione barra: 100 µm in G e 50 µm in G'.*

Stadio follicolare	Controllo	Dose media (1 mg/L)	Dose alta (10 mg/L)
Primordiale	0	0	0
Primario	5	1	6
Secondario	15	41	24
Pre-antrale	163	350	1
Antrale	24	10	52
In atresia	13	35	40
ND	19	0	5

Totale cellule in divisione	239	437	128

Tabella 4. *Numero complessivo di cellule della granulosa in divisione osservate nei diversi stadi follicolari nei tre gruppi sperimentali. Le cellule per le quali non è stato possibile determinare con certezza lo stadio follicolare sono state indicate come non determinate (ND).*

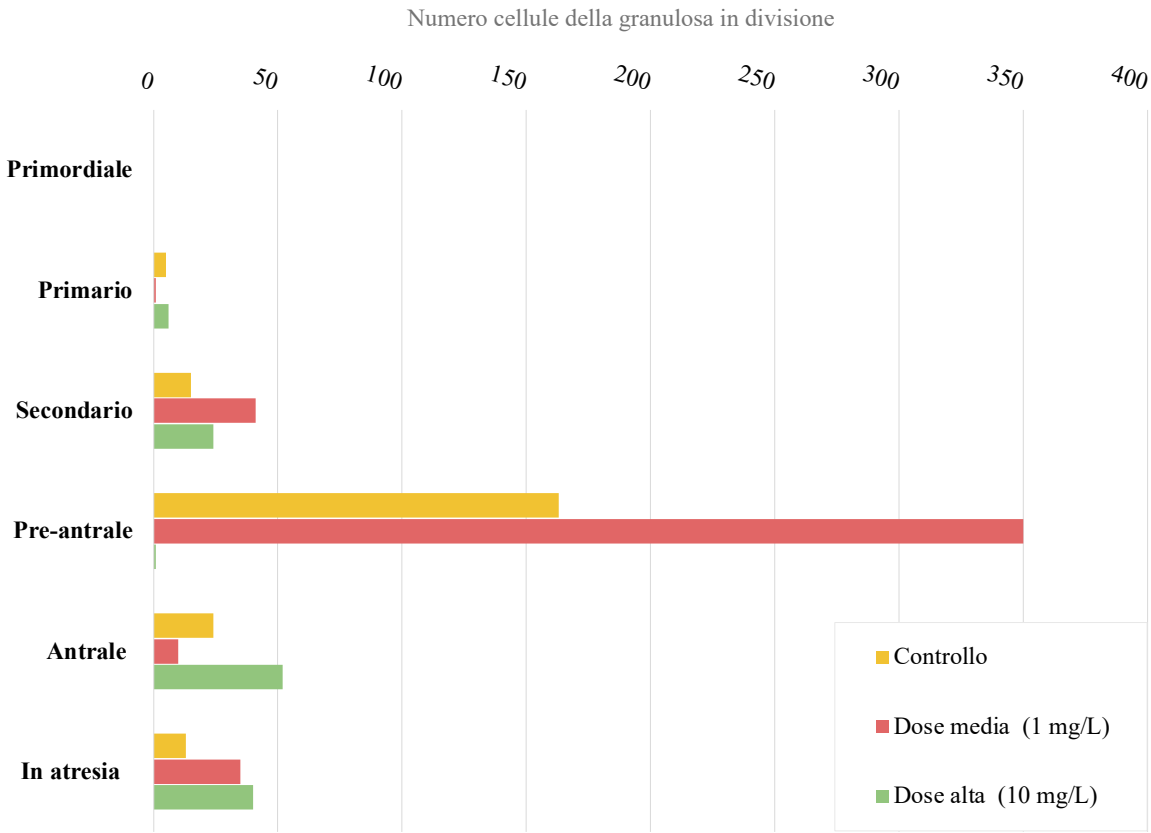


Grafico 3. *Confronto del numero complessivo di cellule della granulosa in divisione osservate nei diversi stadi follicolari nei tre gruppi sperimentali.*

Gli ovari analizzati hanno mostrato la presenza di alcuni follicoli in atresia, riconoscibili per l'estesa disorganizzazione, il distacco delle cellule della granulosa e per l'alterazione del profilo della zona pellucida, che appariva irregolare e deformata (***Fig. 12 H***). Sono stati osservati anche nuclei picnotici, caratterizzati da dimensioni ridotte e da un'intensa colorazione viola scuro-nero (***Fig. 12 I***).

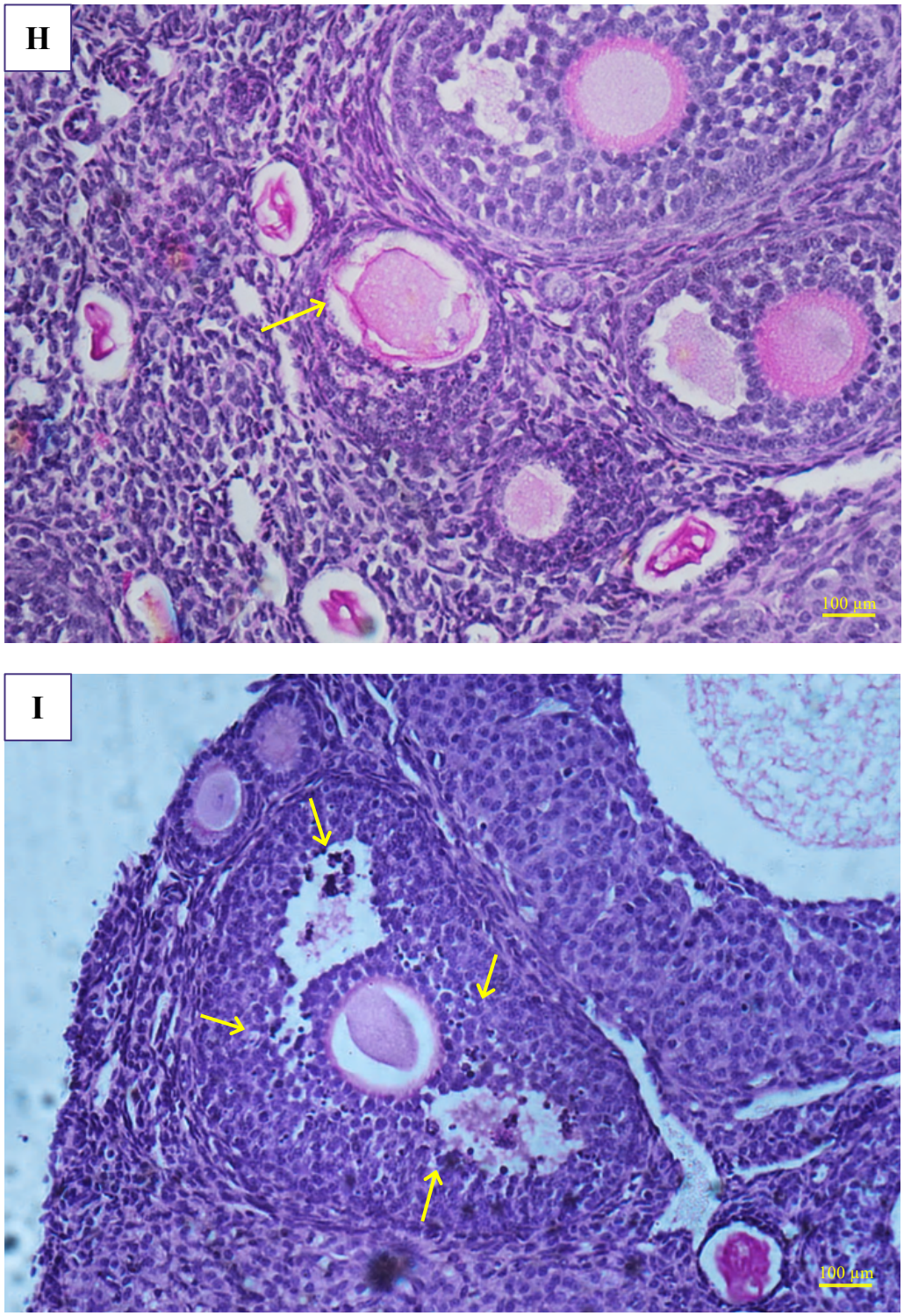


Figura 12: *In H è visibile un follicolo in atresia, con zona pellucida dal profilo deformato. In I si osservano i nuclei dall'aspetto picnotico. Ingrandimento 10x sia in H che in I. Dimensione barra: 100 µm.*

Anche nel gruppo esposto alla dose media di microplastiche (***Fig. 9 C e D***) la struttura ovarica è risultata complessivamente conservata. Nella maggior parte dei campioni sono stati identificati follicoli appartenenti a tutti i diversi stadi dello sviluppo, con un numero complessivo di follicoli simile a quello del gruppo di controllo (382 rispetto a 384). La distribuzione tra i diversi stadi ha mostrato tuttavia alcune variazioni: in particolare, i follicoli antrali sono risultati meno rappresentati rispetto al controllo, con 2 follicoli conteggiati rispetto a 9 (***Tabella 3, Grafico 2***).

Le cellule della granulosa in divisione sono state osservate soprattutto nei follicoli secondari e pre-antrali. In questi ultimi è stato registrato il conteggio più elevato, pari a 350 cellule in divisione, rispetto alle 163 osservate nel gruppo di controllo (***Tabella 4, Grafico 3***).

I follicoli in atresia sono risultati meno numerosi rispetto al controllo, con 21 follicoli conteggiati rispetto a 30, corrispondenti rispettivamente a circa il 5,5% e al 7,8% del totale dei follicoli.

Le alterazioni più evidenti sono state osservate nel gruppo sottoposto alla dose alta di microplastiche. Come si può osservare nella **Figura 9 E**, alcuni ovari apparivano di dimensioni inferiori rispetto a quelle degli altri gruppi (***Fig. 9 A, C***).

Il parenchima ovarico mostrava un'organizzazione irregolare, con una marcata presenza di vasi nella regione corticale e diverse aree dall'aspetto fibroso. I follicoli sono risultati nettamente meno numerosi rispetto agli altri gruppi, con un totale di 97 follicoli conteggiati, rispetto ai 384 del controllo e ai 382 della dose media (***Tabella 3, Grafico 2***). La riduzione ha interessato soprattutto i follicoli primordiali, primari e pre-antrali, rispettivamente pari a 35, 18 e 4 nella dose alta, rispetto a 250, 58 e 19 nel controllo. I pochi follicoli osservati risultavano prevalentemente localizzati alla periferia dell'ovaio, dove apparivano compressi e presentavano caratteristiche morfologiche compatibili con fenomeni di atresia (***Fig. 9 F***). Questa alterazione ha tuttavia reso difficile la classificazione dei follicoli nei diversi stadi di sviluppo.

Parallelamente alla riduzione del numero di follicoli, è stata osservata una riduzione delle cellule della granulosa in divisione e una loro diversa distribuzione rispetto agli altri gruppi. Infatti, nei follicoli pre-antrali è stata osservata una sola cellula in divisione, rispetto alle 163 del gruppo di controllo e alle 350 della dose media. I conteggi più elevati hanno invece riguardato i follicoli antrali e quelli in atresia; in particolare, in quest'ultimi sono state conteggiate 52 cellule in divisione, rispetto alle 24 osservate nel gruppo di controllo (***Tabella 4, Grafico 3***).

Per quanto riguarda i follicoli in atresia, non è stato osservato un aumento del loro numero assoluto, pari a 19. Tuttavia, considerando la marcata riduzione del numero complessivo di follicoli in questo gruppo, questi hanno rappresentato una quota maggiore del totale, pari al 19,6%, rispetto al 7,8% del gruppo di controllo e al 5,5% della dose media.

L'osservazione ha quindi mostrato una struttura ovarica generalmente conservata nei campioni di controllo e in gran parte di quelli esposti alla dose media, sebbene con alcune variazioni minime. Al contrario, nel gruppo trattato con la dose alta sono state riscontrate le alterazioni più evidenti, associate soprattutto ad una riduzione del numero di follicoli.

1.3 Analisi statistica dei conteggi follicolari

Per descrivere le differenze osservate nei conteggi follicolari, sono stati calcolati il numero medio di follicoli e la relativa deviazione standard per ciascuno stadio e gruppo sperimentale, utilizzando i valori dei singoli campioni (***Tabella 5, Grafico 4***).

Come si può osservare, il gruppo di controllo e quello esposto alla dose media mostrano valori medi generalmente più simili tra loro, mentre nel gruppo trattato con la dose alta si osserva una marcata riduzione del numero medio di follicoli, soprattutto negli stadi primordiale, primario e pre-antrale, confermando quanto osservato nei conteggi complessivi riportati nella Tabella 3. Le barre di errore (***Grafico 4***), corrispondenti alla deviazione standard, mostrano la variabilità dei valori tra i singoli campioni all'interno di ciascun gruppo sperimentale.

Stadio follicolare	Controllo	Dose media (1 mg/L)	Dose alta (10 mg/L)
Primordiale	62,5 ± 8,54	58,50 ± 45,81	8,75 ± 10,63
Primario	14,5 ± 1,73	15,50 ± 10,21	4,5 ± 5,13
Secondario	4,5 ± 3,11	10,50 ± 7,055	4,75 ± 5,31
Pre-antrale	4,75 ± 1,5	5,25 ± 2,22	1 ± 1,1
Antrale	2,25 ± 0,96	0,5 ± 0,58	0,5 ± 0,55
In atresia	7,5 ± 3,32	5,25 ± 3,77	4,75 ± 3,49

Tabella 5. *Confronto tra i valori della media ± la deviazione standard relativi al numero di follicoli nei diversi stadi di sviluppo nei tre gruppi sperimentali.*

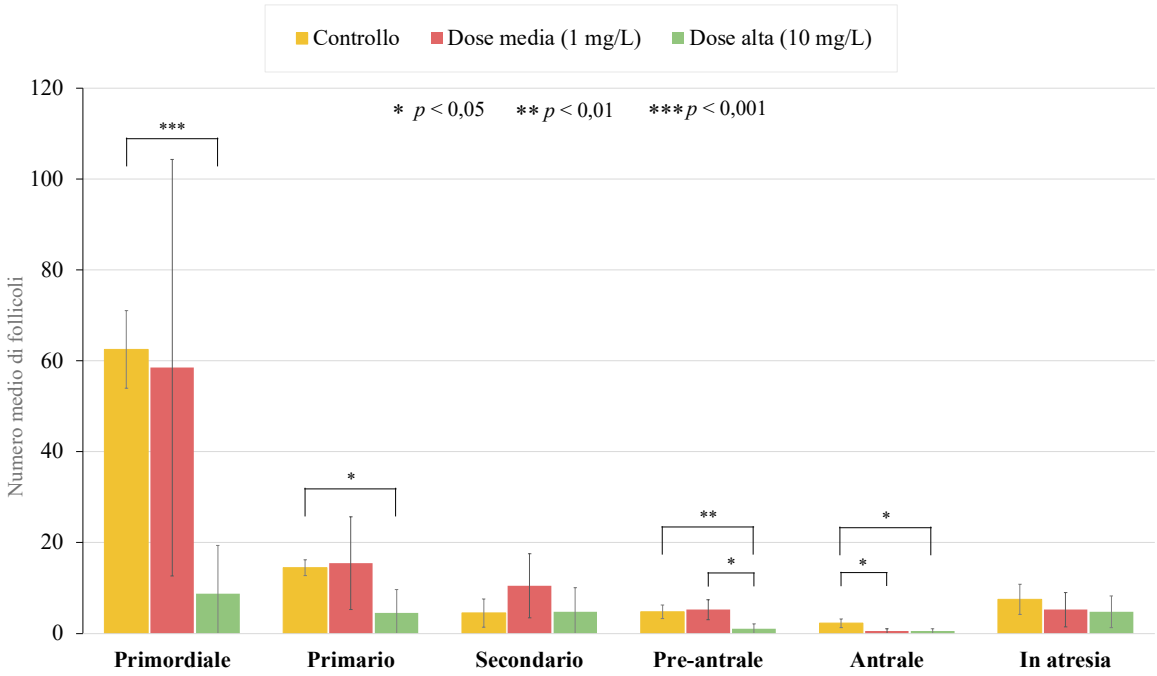


Grafico 4*: Confronto del numero medio di follicoli nei diversi stadi di sviluppo tra i gruppi controllo, dose media e dose alta. Gli asterischi (*) indicano il livello di significatività statistica ottenuto mediante il test del T-student.*

Le differenze tra i gruppi sperimentali sono state successivamente valutate mediante il test *T-student*, effettuando confronti a coppie tra: controllo (CTR) e dose media (DM), controllo e dose alta (DA) e infine dose media e dose alta, come riportato nella **Tabella 6**.

L'analisi ha evidenziato differenze statisticamente significative soprattutto nel confronto tra il gruppo di controllo e quello esposto alla dose alta. In particolare, nel gruppo trattato con la dose alta è stata osservata una riduzione statisticamente significativa del numero di follicoli primordiali (p = 0,0003), primari (p = 0,0128) e pre-antrali (p = 0,0074) rispetto al controllo. Per i follicoli pre-antrali è emersa anche una differenza statisticamente significativa tra dose media e dose alta (p = 0,0145). Anche il numero medio di follicoli antrali è risultato significativamente ridotto rispetto al controllo, sia nel gruppo trattato con la dose media (p = 0,0203), sia in quello trattato con la dose alta (p = 0,0203). Per i follicoli secondari e quelli in atresia non sono state invece rilevate delle differenze statisticamente significative (p > 0,05).

Questi risultati indicano quindi che le variazioni più marcate interessano principalmente il gruppo esposto alla dose alta, come quanto riscontrato precedentemente.

Stadio follicolare	**CTR vs DM**	**CTR vs DA**	**DM vs DA**
Primordiale	p = 0,8694	p = 0,0003	p = 0,0797
Primario	p = 0,8533	p = 0,0128	p = 0,1061
Secondario	p = 0,1703	p = 0,9405	p = 0,2492
Pre-antrale	p = 0,7216	p = 0,0074	p = 0,0145
Antrale	p = 0,0203	p = 0,0203	p = 1,0000
In atresia	p = 0,4050	p = 0,2779	p = 0,8466

Tabella 6. *Valori di p-value ottenuti mediante test del T-student nei confronti a coppie tra i tre gruppi sperimentali per ciascuno stadio follicolare.*

2. Analisi *in vitro* degli effetti delle nanoplastiche

Per l'analisi della maturazione degli oociti *in vitro* sono state prese in esame 18 femmine del ceppo B6D2F1 di circa 4-6 settimane, dalle quali sono stati isolati complessivamente 868 oociti antrali in GV.

2.1 Maturazione *in vitro* degli oociti

Per valutare l'effetto dell'esposizione alle nanoplastiche sulla maturazione *in vitro*, è stata confrontata la resa di maturazione degli oociti antrali coltivati in terreno α-MEM (oociti di controllo) con quella degli oociti coltivati nel terreno α-MEM addizionato con nanoplastiche di polistirene (PS-NP) di diametro pari a 0,025 μm.

La resa di maturazione è stata valutata considerando gli oociti in MII ed è stata espressa come percentuale rispetto al totale degli oociti analizzati in ciascun gruppo. Sono stati considerati anche gli oociti che non avevano completato la maturazione, raggruppando in un'unica categoria quelli rimasti allo stadio di GV e quelli arrestati (***Tabella 7, Grafico 5***).

	Oociti totali (n)	**MII n (%)**	**Arrestati n (%)**
Controllo (CTR)	321	192 (~ 60%)	129 (~ 40%)
Nanoplastiche	547	298 (~ 55%)	249 (~ 45%)

Tabella 7. *Oociti antrali coltivati in vitro nei gruppi di controllo e trattato con nanoplastiche, classificati in base all'esito della maturazione: oociti che hanno raggiunto la MII e oociti rimasti allo stadio di GV o arrestati. I valori sono riportati come numero di oociti (n) e percentuale sul totale (%).*

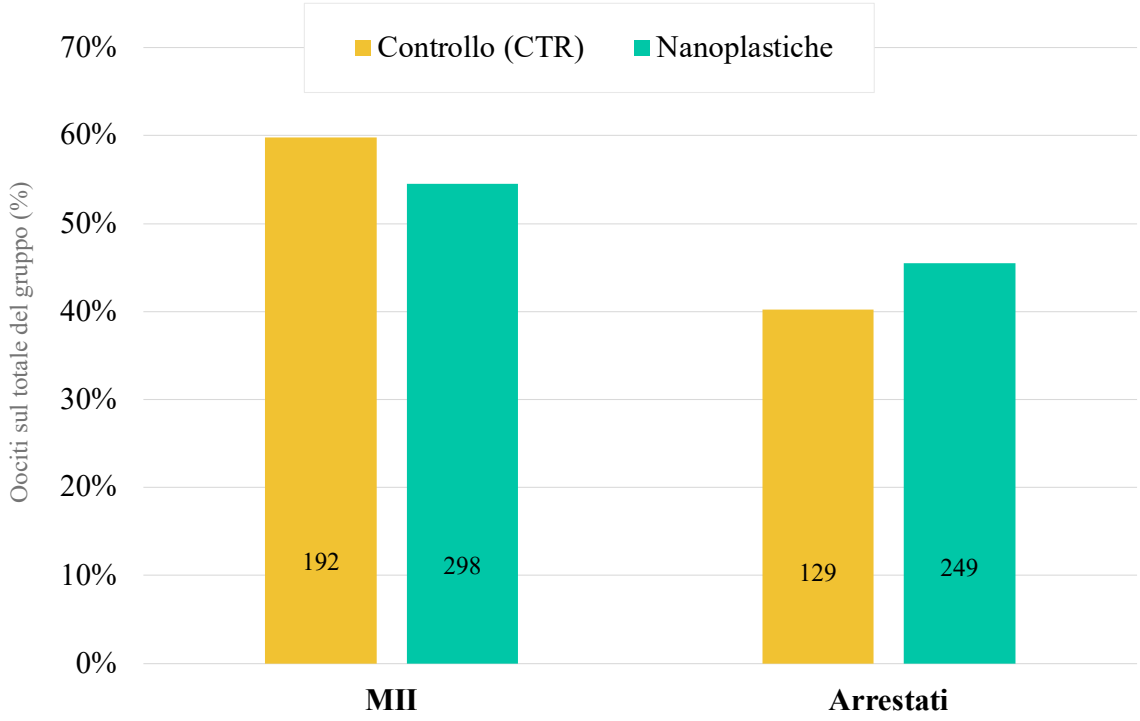


Grafico 5. *Confronto in percentuale degli esiti della maturazione ovocitaria in vitro tra il gruppo di controllo e quello trattato con nanoplastiche; i numeri all'interno delle colonne indicano il numero degli oociti analizzati in ciascuna categoria.*

Come riportato nella **Tabella 7** e nel **Grafico 5**, nel gruppo di controllo 192 oociti dei 321 analizzati hanno raggiunto lo stadio MII, corrispondenti a una resa di maturazione del 59,8%. Nel gruppo esposto alle nanoplastiche, invece, hanno raggiunto lo stadio di MII 298 oociti dei 547 analizzati, con una resa del 54,5%. Si osserva quindi una resa di maturazione inferiore nel gruppo trattato, con una differenza di circa 5 punti percentuali rispetto al controllo. Parallelamente, la percentuale di oociti rimasti allo stadio GV o arrestati durante la maturazione è risultata pari al 40,2% nel controllo e al 45,5% nel gruppo trattato.

Il confronto tra le percentuali di maturazione dei singoli esperimenti, effettuato mediante test *T-student*, non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra il gruppo di controllo e quello esposto alle nanoplastiche ($p = 0,3571$).

2.2 Valutazione dell'internalizzazione delle nanoplastiche negli oociti

Per verificare se le nanoplastiche fossero in grado di entrare negli oociti, i campioni esposti sono stati analizzati mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM).

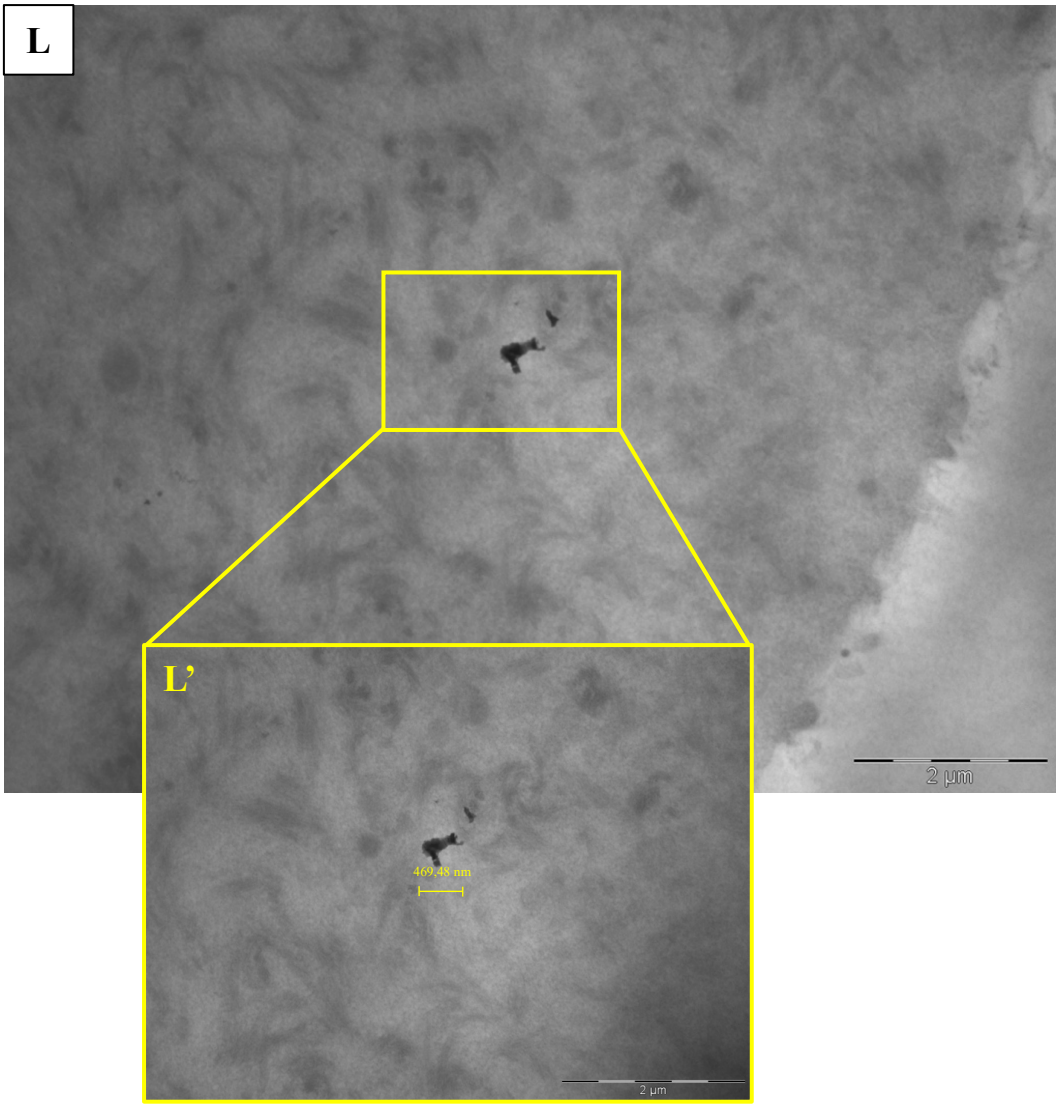


Figura 13. *Immagini al TEM di un oocita in MII coltivato in presenza di nanoplastiche. Il riquadro giallo evidenzia la regione del citoplasma in cui è visibile un aggregato di nanoplastiche di circa 469 nm. Ingrandimento 12.000x in L e 20.000x in L'.*

Come si può osservare nella **Figura 13**, l'analisi mediante TEM degli oociti esposti a nanoplastiche ha evidenziato la loro presenza all'interno del citoplasma, in prossimità della regione corticale.

2.3 Valutazione dello stress ossidativo mediante analisi dei ROS

Per la valutazione dello stress ossidativo sono stati considerati 254 oociti in MII nel corso di cinque esperimenti indipendenti, suddivisi sempre tra il gruppo di controllo e il gruppo esposto alle nanoplastiche. Prima dell'analisi sono stati esclusi gli oociti non vitali, ottenendo un numero finale di 238 oociti analizzati, di cui 96 appartenenti al gruppo di controllo e 142 al gruppo trattato.

La produzione intracellulare di ROS è stata valutata mediante un'analisi qualitativa e semi-quantitativa della fluorescenza emessa dalla sonda DCFH-DA. Le immagini acquisite al microscopio confocale sono state esaminate considerando la presenza, l'intensità e la distribuzione del segnale verde negli oociti appartenenti al gruppo di controllo (CTR) e al gruppo esposto (PS-NP). Sulla base dell'intensità osservata, gli oociti sono stati classificati in quattro categorie: segnale assente (-), debole (+), moderato (++) e intenso (+++).

Intensità del segnale ROS	CTR (media %)	PS-NP (media %)
Assente (-)	72%	47%
Debole (+)	11%	9%
Moderata (++)	13%	31%
Intensa (+++)	4%	13%

Tabella 8. *Confronto delle frequenze percentuali medie degli oociti in MII nelle diverse categorie di intensità di segnale ROS nei gruppi di controllo e nanoplastiche; i valori rappresentano la media delle percentuali ottenute nei cinque esperimenti indipendenti.*

Come si può osservare nella **Tabella 8** e nel **Grafico 6**, considerando la media delle percentuali ottenute nei cinque esperimenti, nel gruppo di controllo prevalgono gli oociti caratterizzati da un segnale ROS assente o non rilevabile, mentre le categorie a maggiore intensità risultano meno rappresentate. Negli oociti esposti alle nanoplastiche si osserva invece una riduzione degli oociti con segnale assente e un aumento di segnali moderati e

intensi. La categoria corrispondente a un segnale debole risulta, invece, comparabile tra i due gruppi.

L'esposizione alle nanoplastiche sembra quindi essere associata ad una maggiore presenza di oociti caratterizzati da un segnale ROS più intenso, compatibile con un possibile aumento della produzione intracellulare di ROS e dello stress ossidativo.

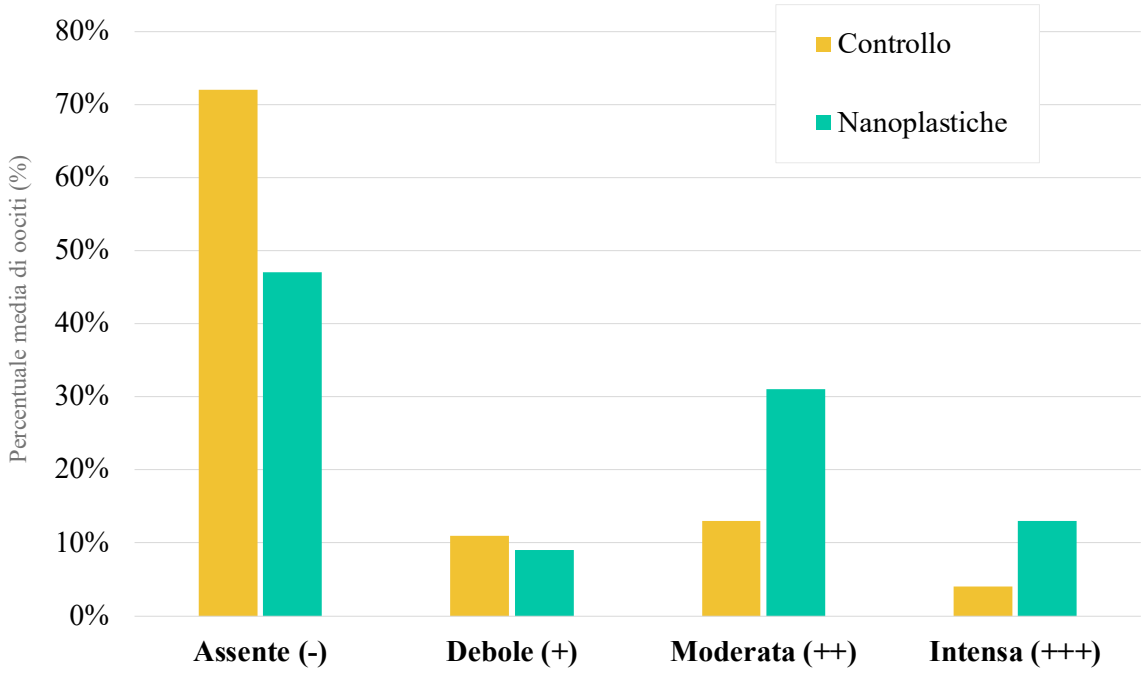


Grafico 6. *Frequenza percentuale media degli oociti nelle diverse categorie di intensità del segnale ROS.*

Successivamente, il segnale ROS è stato valutato mediante un'analisi semi-quantitativa dell'intensità di fluorescenza nei singoli oociti appartenenti ai due gruppi sperimentali. L'analisi del segnale fluorescente mediante il *software* di elaborazione delle immagini acquisite al microscopio confocale ha permesso di ottenere, per ciascun oocita, un profilo di intensità del segnale, espresso in termini di *pixel* su una scala compresa tra 0 e 4095 lungo i tre assi (x, y e z). I valori ottenuti sono stati successivamente analizzati considerando separatamente le quattro categorie di intensità precedentemente individuate (- assente, + debole, ++ moderata e +++ intensa), sia nel gruppo di controllo sia nel gruppo esposto alle nanoplastiche (***Fig. 14***, ***Fig. 15***, ***Fig. 16***, ***Fig.17***).

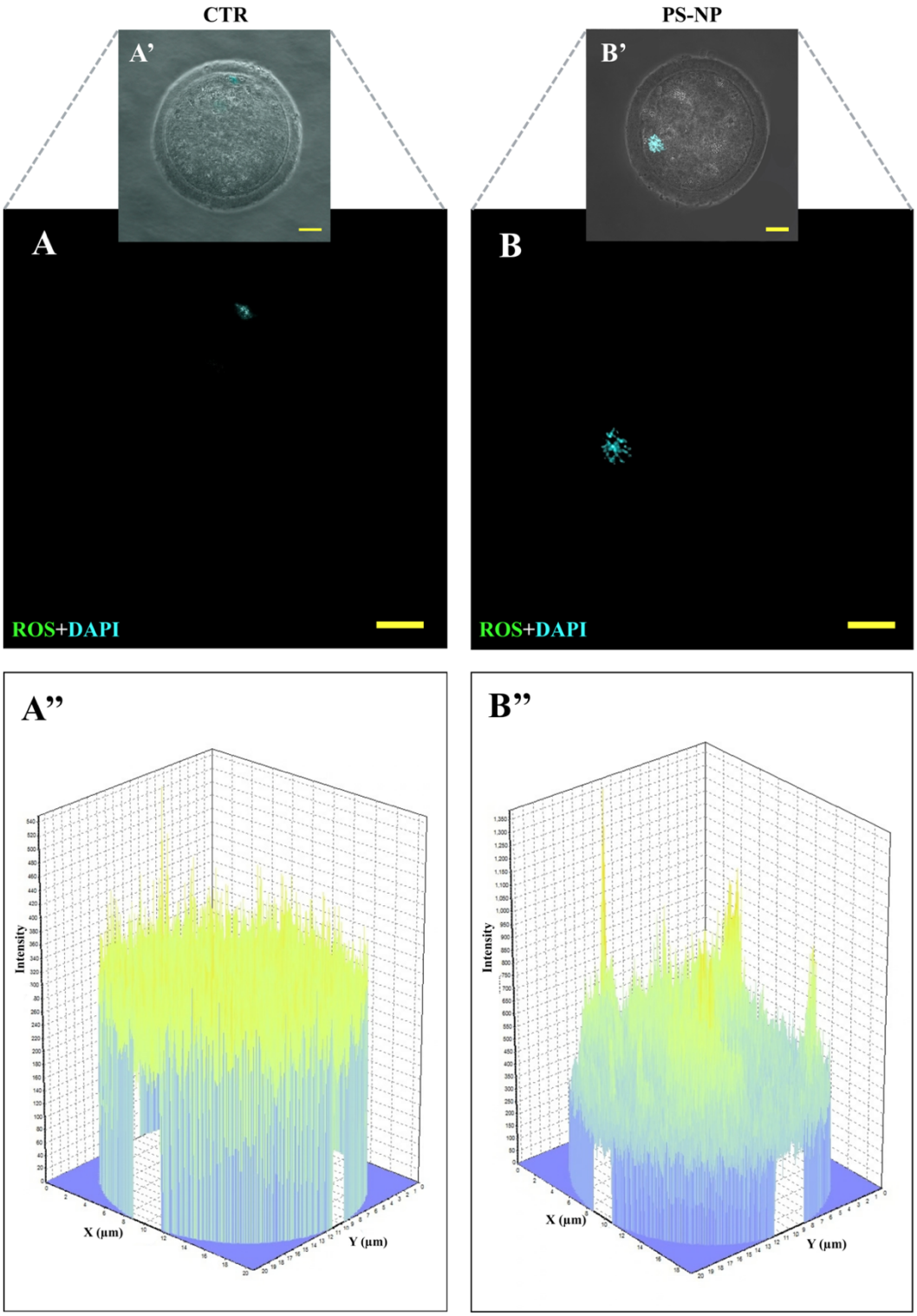


Figura 14. *Segnale ROS assente (-). In A e B immagini della fluorescenza emessa dalla sonda DCFH-DA (segnale verde) negli oociti appartenenti rispettivamente al gruppo di controllo e al gruppo esposto alle nanoplastiche. In A' e B' sono riportate le corrispondenti immagini in contrasto di fase. In A" e B" sono rappresentati i relativi profili di intensità del segnale fluorescente. Ingrandimento 90x. Dimensione barra: 10 µm. Cromatina colorata con DAPI.*

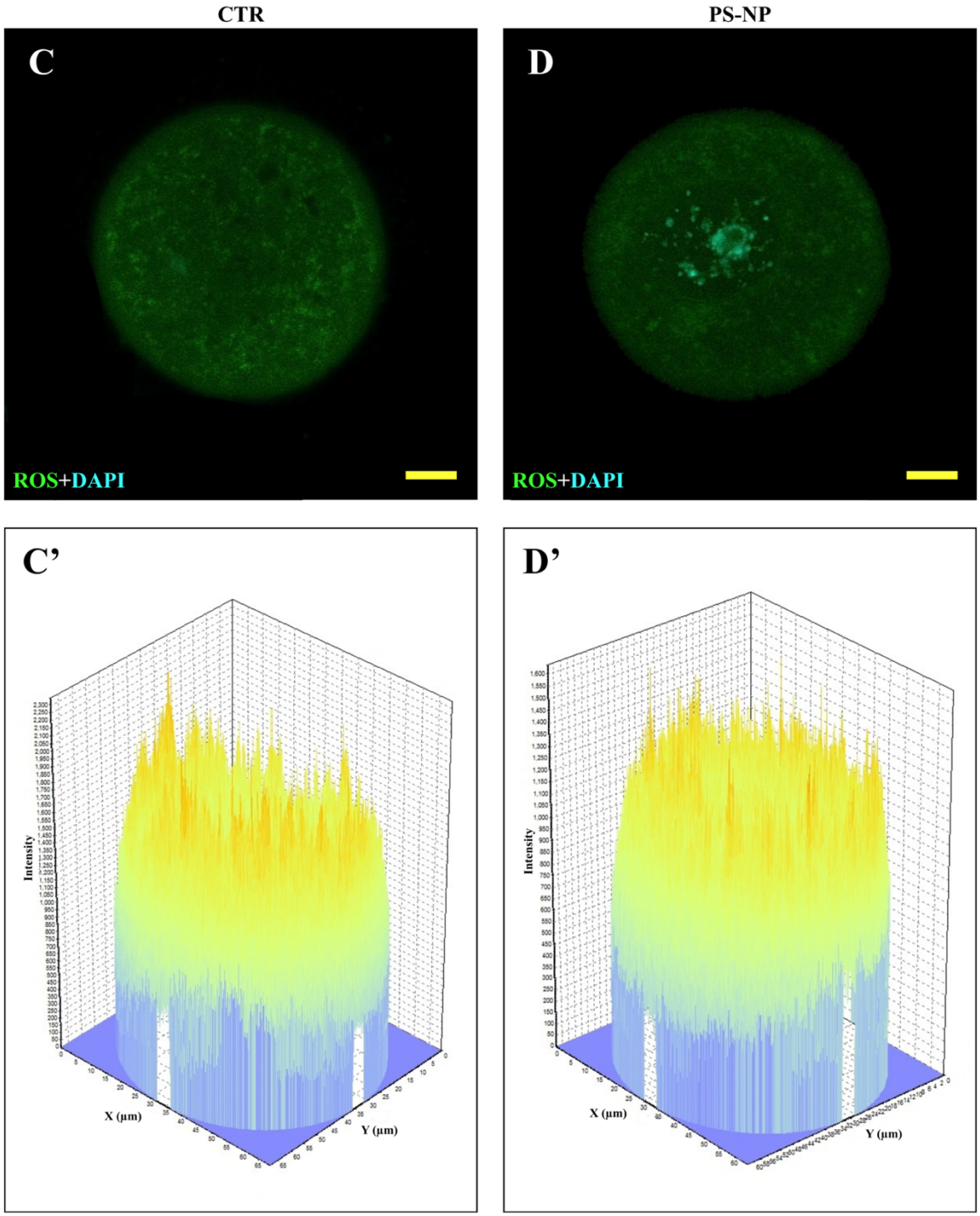


Figura 15. *Segnale ROS debole (+). In C e D immagini della fluorescenza emessa dalla sonda DCFH-DA (segnale verde) negli oociti appartenenti rispettivamente al gruppo di controllo e al gruppo esposto alle nanoplastiche. In C' e D' sono rappresentati i corrispondenti profili di intensità in cui i picchi arancioni rappresentano un'elevata intensità di segnale e quelli gialli una bassa intensità. Ingrandimento 90x. Dimensione barra: 10 µm. Cromatina colorata con DAPI.*

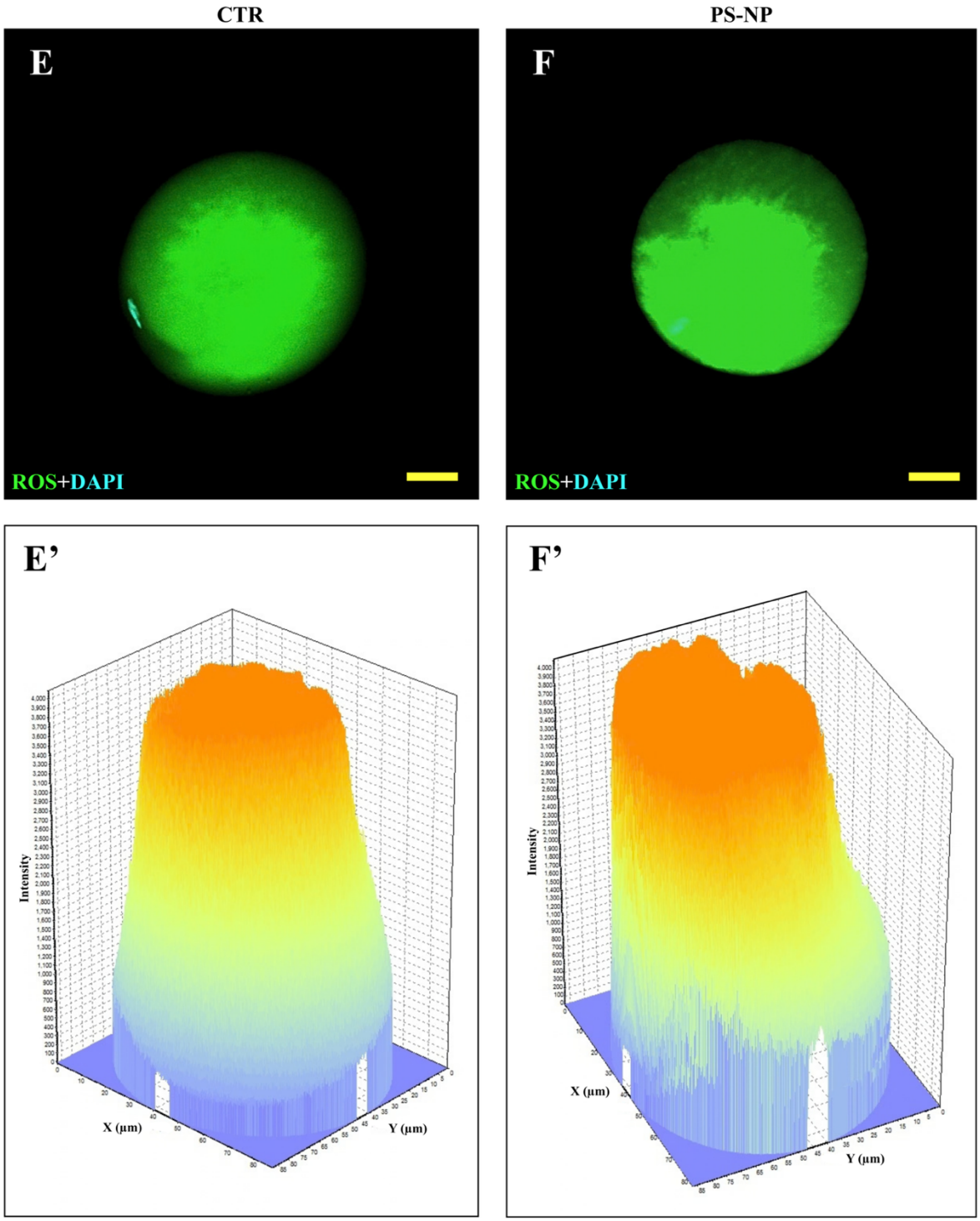


Figura 16. *Segnale ROS moderato (++). In E e F immagini della fluorescenza emessa dalla sonda DCFH-DA (segnale verde) negli oociti appartenenti rispettivamente al gruppo di controllo e al gruppo esposto alle nanoplastiche. In E' e F' sono rappresentati i corrispondenti profili di intensità in cui i picchi arancioni rappresentano un'elevata intensità di segnale e quelli gialli una bassa intensità. Ingrandimento 60x. Dimensione barra: 10 µm. Cromatina colorata con DAPI.*

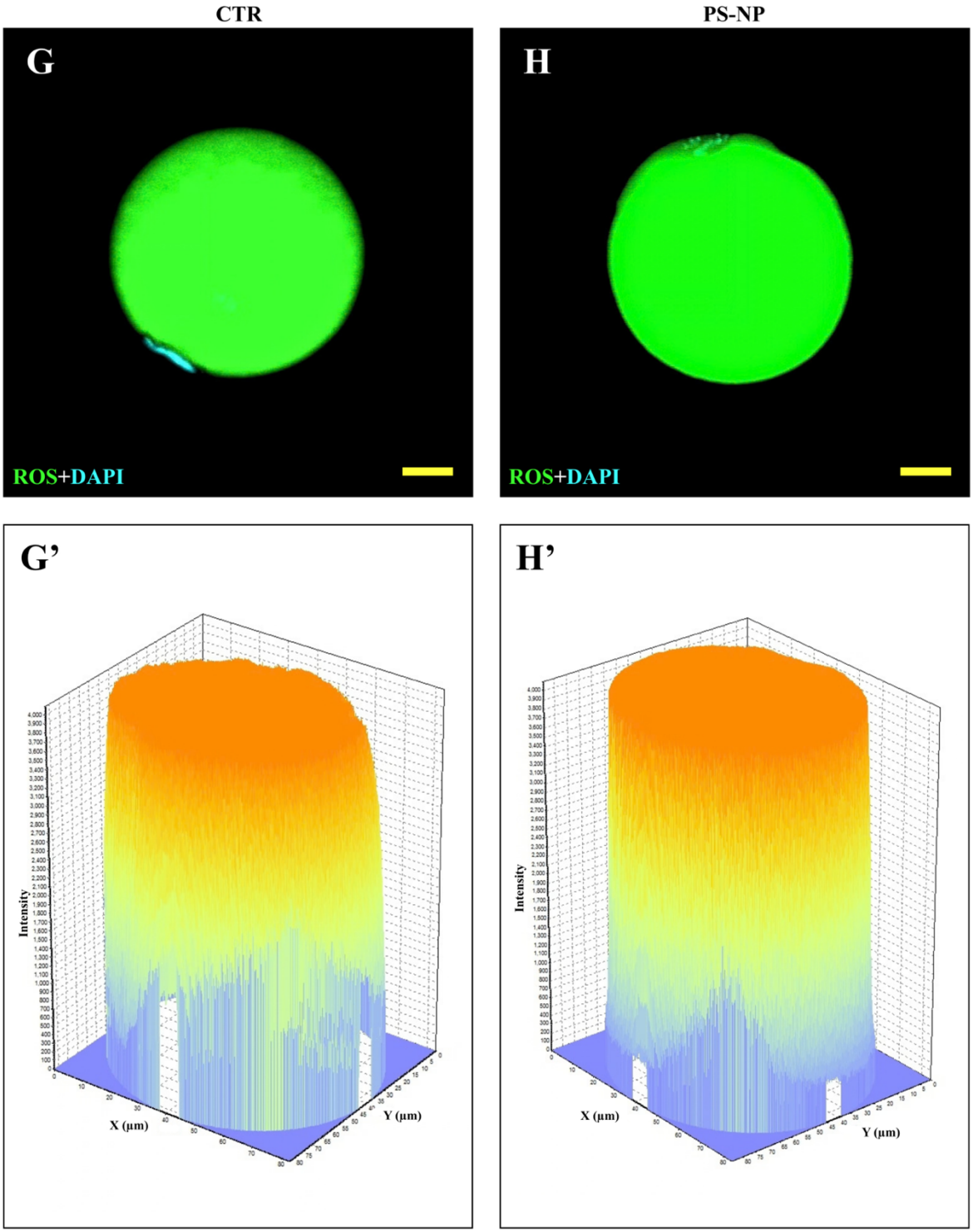


Figura 17. *Segnale ROS intenso (+++). In G e H immagini della fluorescenza emessa dalla sonda DCFH-DA (segnale verde) negli oociti appartenenti rispettivamente al gruppo di controllo e al gruppo esposto alle nanoplastiche. In G' e H' sono rappresentati i corrispondenti profili di intensità in cui i picchi arancioni rappresentano un'elevata intensità di segnale e quelli gialli una bassa intensità. Ingrandimento 60x. Dimensione barra: 10 µm. Cromatina colorata con DAPI.*

Per ciascuna categoria di intensità e per ciascun gruppo sperimentale sono stati successivamente calcolati il valore medio dell'intensità di fluorescenza e la relativa deviazione standard, come riportato nella **Tabella 9**.

Intensità del segnale ROS	CTR (media ± DS)	PS-NP (media ± DS)
Assente (-)	432,48 ± 148,39	508,64 ± 244,30
Debole (+)	1059,16 ± 322,67	1220,77 ± 380,93
Moderata (++)	2299,89 ± 365,32	2384,22 ± 516,89
Intensa (+++)	3596,71 ± 153,51	3642,69 ± 254,31

Tabella 9. *Confronto tra i valori della media ± la deviazione standard relativi all'intensità del segnale fluorescente ROS nelle diverse categorie di intensità nei due gruppi sperimentali.*

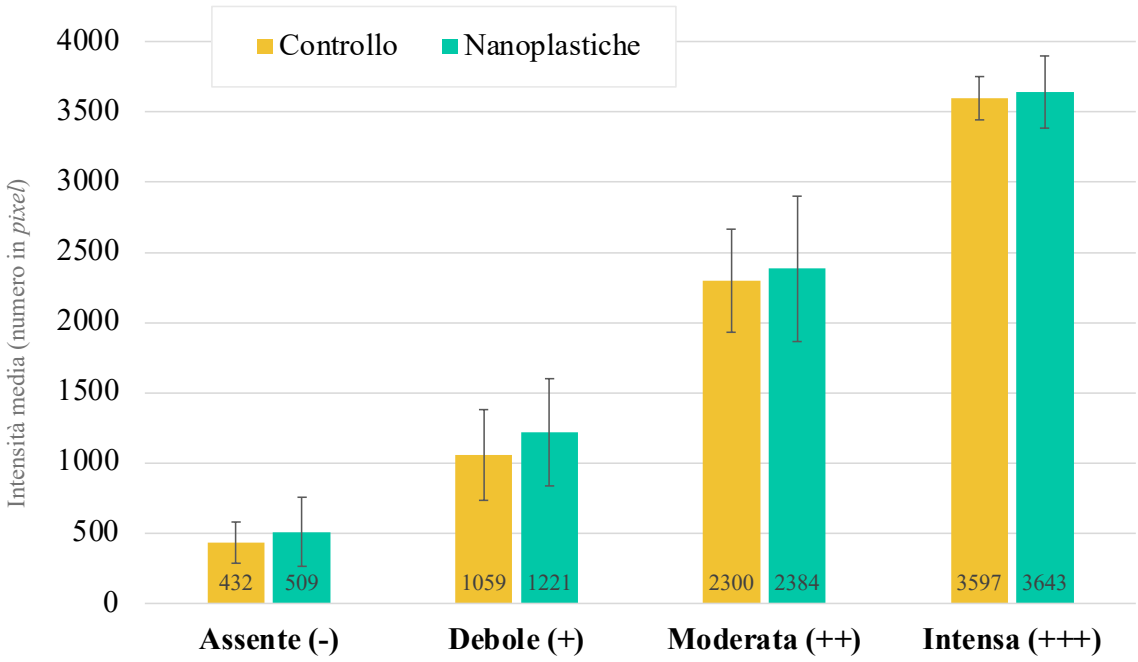


Grafico 7. *Confronto dell'intensità media del segnale ROS nelle diverse categorie di intensità tra il gruppo di controllo e quello esposto a nanoplastiche.*

Come riportato nella **Tabella 9** e nel **Grafico 7**, in entrambi i gruppi l'intensità media del segnale fluorescente aumenta progressivamente passando dalla categoria di segnale assente o trascurabile (-) a quella di segnale intenso (+++). In tutte le categorie, gli oociti esposti alle nanoplastiche mostrano valori medi di intensità leggermente superiori rispetto ai rispettivi controlli.

Le differenze tra il gruppo di controllo e il gruppo esposto alle nanoplastiche sono state successivamente valutate mediante il test *T-student*, per ogni categoria di intensità. Nonostante le differenze osservate visivamente negli oociti trattati, le variazioni nelle categorie debole (+), moderata (++) e intensa (+++) non risultano statisticamente significative (rispettivamente $p = 0,2942$; $p = 0,6364$; $p = 0,7565$).

DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi sperimentale sono stati analizzati gli effetti delle micro- e nanoplastiche sul sistema riproduttivo femminile nel modello murino, attraverso due approcci sperimentali complementari. L'analisi *in vivo* ha permesso di valutare la morfologia ovarica e la distribuzione dei follicoli nei diversi stadi di sviluppo in seguito all'esposizione a microplastiche di polistirene, mentre l'analisi *in vitro* è stata utilizzata per studiare l'internalizzazione delle nanoplastiche di polistirene negli oociti e suoi possibili effetti sulla maturazione ovocitaria e sulla produzione di specie reattive dell'ossigeno.
I risultati ottenuti hanno evidenziato differenze significative tra i gruppi di controllo e quelli esposti, che sono state confrontate con quanto già riportato in letteratura.

1. Effetti delle microplastiche sulla morfologia ovarica e sulla follicologenesi

1.1 Alterazioni della struttura ovarica

L'analisi morfo-istologica ha evidenziato differenze nell'organizzazione del tessuto ovarico tra i gruppi dopo i 35 giorni di esposizione a microplastiche di polistirene, particolarmente evidenti nelle topoline trattate con la dose alta. In questo gruppo, le sezioni ovariche presentavano dimensioni apparentemente ridotte e un parenchima più disorganizzato, nel quale i follicoli integri risultavano poco numerosi e spesso difficilmente classificabili. Nel gruppo esposto alla dose media, invece, l'organizzazione generale del tessuto era prevalentemente conservata. Queste osservazioni suggeriscono che, l'esposizione alla concentrazione più elevata di microplastiche possa compromettere il mantenimento della normale struttura ovarica.

Un risultato coerente con queste osservazioni è stato riportato nel 2022 da Wei *et al.*, [35], che hanno studiato gli effetti dell'esposizione a microplastiche di polistirene trattando i topi con una dose di 0,1 mg/giorno per 30 e 44 giorni. Nelle femmine esposte, gli autori hanno osservato ovaie di dimensioni inferiori rispetto ai controlli e una minore presenza di follicoli nei diversi stadi di sviluppo, con una riduzione statisticamente significativa del loro numero totale [35]. Questi risultati sono quindi in accordo con quanto osservato in questo studio, soprattutto nel gruppo esposto alla dose alta.

Alterazioni simili sono state riportate nel 2023 anche da Wu *et al.*, [36], che hanno studiato gli effetti delle microplastiche di polistirene e del plastificante DEHP (*di-(2-ethylhexyl) phthalic acid*) in un modello murino e in colture di cellule della granulosa,

somministrati singolarmente e in combinazione. Gli autori hanno osservato follicoli dalla forma irregolare e cellule della granulosa disposte in modo meno compatto, con danni più marcati in seguito alla co-esposizione, il che, secondo loro, contribuiva alla compromissione della funzione ovarica [36]. Queste alterazioni presentano somiglianze con la disorganizzazione osservata nel gruppo trattato con la dose alta.

1.2 Distribuzione dei follicoli e atresia

L'analisi quantitativa ha permesso di approfondire le differenze osservate a livello morfologico, evidenziando quali stadi follicolari fossero maggiormente interessati. Nel gruppo esposto alla dose alta, il numero medio di follicoli primordiali, primari, pre-antrali e antrali è risultato significativamente inferiore rispetto al controllo. Nella dose media, invece, la riduzione ha riguardato soltanto i follicoli antrali. La riduzione dei follicoli osservata potrebbe essere associata a un'interferenza delle microplastiche con i processi che ne regolano la maturazione.

Una possibile interpretazione di queste alterazioni emerge dallo studio del 2021 di Hou *et al.*, [37], nel quale l'esposizione a microplastiche di polistirene in femmine di ratto Wistar ha determinato una riduzione dei follicoli in accrescimento, accompagnata da stress ossidativo e da un aumento della morte delle cellule della granulosa [37]. Queste evidenze suggeriscono che la riduzione delle cellule follicolari potrebbe ridurre il supporto fornito all'oocita e compromettere lo sviluppo e la sopravvivenza del follicolo, contribuendo così alla riduzione dei follicoli osservata.

In particolare, lo studio di Hou *et al.* ha evidenziato il coinvolgimento della via NLRP3/Caspasi-1 nei processi di piroptosi, insieme ad un aumento dell'apoptosi delle cellule della granulosa (***Fig. 18***) [37]. Il danno a queste cellule potrebbe contribuire alla degenerazione dei follicoli e rappresentare una possibile spiegazione della loro disorganizzazione e della presenza di nuclei picnotici osservati *in vivo*, anche se questi aspetti non permettono di stabilire con certezza quale meccanismo di morte cellulare sia coinvolto.

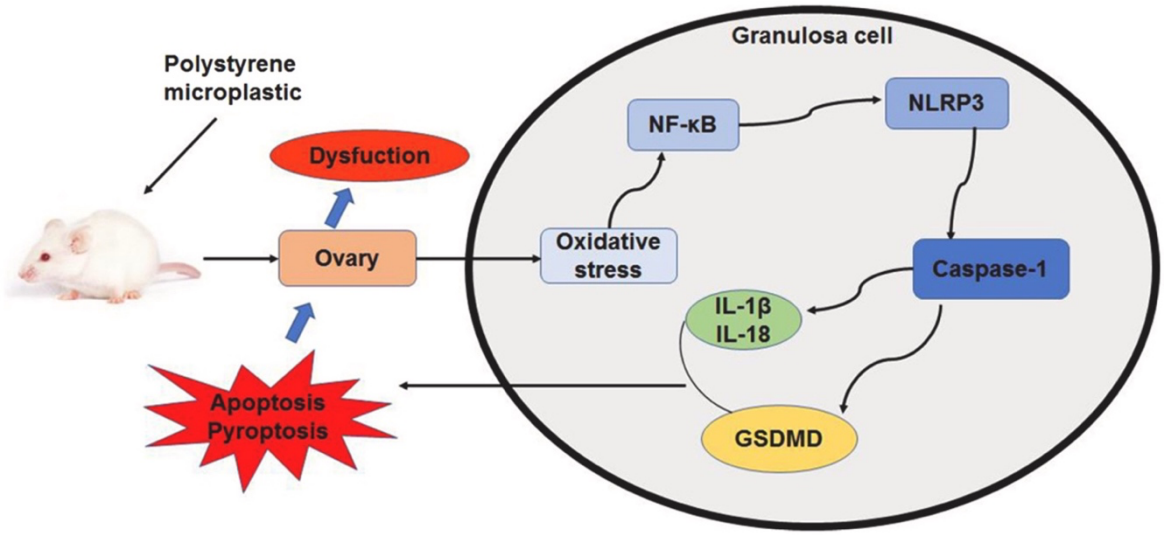


Figura 18. *Schema del meccanismo proposto da Hou et al per il danno ovarico indotto dalle microplastiche di polistirene, con il coinvolgimento dello stress ossidativo e della via NLRP3/Caspasi-1 nella morte delle cellule della granulosa. Immagine tratta da [37].*

Per quanto riguarda l'atresia follicolare, i dati ottenuti nel presente lavoro di tesi mostrano che i follicoli atresici rappresentavano il 19,6% del totale nel gruppo esposto alla dose alta, rispetto al 7,8% del controllo.

Un coinvolgimento dell'atresia negli effetti delle microplastiche sull'ovaio è stato riportato anche nel 2025 da *Jeong et al.,* [38], che hanno osservato un aumento dell'atresia follicolare e dell'apoptosi delle cellule della granulosa in femmine di topo esposte per 35 giorni a microplastiche di polistirene. Gli autori hanno inoltre rilevato un aumento della caspasi 3 attivata e una riduzione della proteina antiapoptotica Bcl-2, a sostegno del coinvolgimento dell'apoptosi nel danno alle cellule della granulosa [38]. Questi risultati supportano quindi la possibile relazione tra il danno alle cellule della granulosa e l'atresia follicolare, offrendo una spiegazione alle caratteristiche degenerative osservate nei follicoli del gruppo esposto alla dose alta.

1.3 Cellule della granulosa in divisione

Il conteggio delle cellule della granulosa in divisione ha evidenziato differenze nella loro distribuzione tra i diversi stadi follicolari. Nel gruppo di controllo e nel gruppo esposto alla dose media, queste cellule erano localizzate prevalentemente nei follicoli pre-antrali, con un numero maggiore di cellule osservato nella dose media rispetto al controllo. Al contrario,

nel gruppo esposto alla dose alta, i conteggi più elevati sono stati rilevati nei follicoli antrali e in quelli in atresia.

La scarsa presenza di cellule in divisione nei follicoli pre-antrali della dose alta potrebbe essere associata ad un'alterazione dell'attività proliferativa della granulosa. Nel 2023 Wu *et al.,* [36] hanno descritto alterazioni dei meccanismi coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare delle cellule della granulosa associando gli effetti della co-esposizione di microplastiche di polistirene e DEHP ad un aumento dello stress ossidativo, al danno ossidativo al DNA e ad alterazioni della via Hippo (via di segnalazione coinvolta nella regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare). Questi effetti erano accompagnati da arresto del ciclo cellulare e necroptosi, suggerendo che potesse essere compromessa non solo la sopravvivenza cellulare, ma anche la capacità delle cellule follicolari di proseguire normalmente nel ciclo cellulare [36].
Un meccanismo simile potrebbe quindi contribuire alla ridotta presenza di cellule in divisione nei follicoli pre-antrali della dose alta. Tuttavia, in questo gruppo era presente anche un numero inferiore di follicoli pre-antrali e il conteggio effettuato non ha permesso di stabilire se l'attività proliferativa fosse davvero diminuita o se ciò dipendesse semplicemente dal minor numero di follicoli presenti in questo stadio. Inoltre, la presenza di cellule in divisione nei follicoli antrali e atresici non suggerisce una scomparsa generale dell'attività mitotica, bensì invece una sua diversa distribuzione tra i follicoli osservati.

2. Effetti delle nanoplastiche sugli oociti nel modello murino *in vitro*

2.1 Esposizione alle nanoplastiche e maturazione ovocitaria

In questo studio, la percentuale di oociti che hanno raggiunto lo stadio di MII è risultata leggermente inferiore nel gruppo trattato con PS-NP rispetto al controllo. Tuttavia, il confronto tra le percentuali di maturazione dei singoli esperimenti, effettuato mediante il test *T-student*, non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p = 0,3571$). Nelle condizioni sperimentali utilizzate e dai dati ottenuti, non è stata quindi rilevata una correlazione tra l'esposizione alle nanoplastiche e la resa di maturazione ovocitaria.

Nella valutazione dei possibili effetti delle nanoplastiche durante la maturazione *in vitro*, è necessario considerare la loro interazione con il terreno di coltura. In presenza di proteine, queste possono adsorbirsi sulla superficie delle particelle, formando un

rivestimento chiamato corona proteica che modifica la superficie con cui le nanoplastiche interagiscono con l'ambiente circostante e con le cellule [27].

Nel 2021, Li *et al.*, [39] hanno studiato questo fenomeno utilizzando l'albumina sierica bovina e diversi sali, mostrando che gli effetti sulla stabilità delle particelle dipendevano dalle loro caratteristiche superficiali e dalla composizione della soluzione. In alcune condizioni, l'adsorbimento dell'albumina favoriva la dispersione delle nanoplastiche, mentre in altre ne aumentava l'aggregazione [39].

La formazione della corona proteica può inoltre modificare la risposta cellulare alle particelle. Kihara *et al.*, [40] utilizzando cellule epiteliali alveolari umane e nanoplastiche di polistirene, hanno osservato che il rivestimento delle particelle con albumina sierica umana o lisozima ne attenuava la citotossicità rispetto alle particelle prive di rivestimento [40]. La presenza di proteine sulla superficie delle nanoplastiche non deve quindi essere considerata necessariamente un fattore che ne aumenta la tossicità, ma può anche limitarne gli effetti.

Queste osservazioni suggeriscono che, nel nostro sistema di coltura, l'interazione delle PS-NP con le componenti del terreno potrebbe aver modificato sia la loro dispersione, sia il modo in cui entravano in contatto con gli oociti poiché potrebbe essersi formata una corona proteica sulla superficie delle nanoplastiche. Questo rivestimento potrebbe aver attenuato gli effetti delle particelle, come osservato da Kihara *et al,* [40] contribuendo alla differenza contenuta nella resa di maturazione tra controllo e trattato. La risposta all'esposizione potrebbe quindi dipendere non soltanto dalla concentrazione e dalle dimensioni iniziali delle particelle, ma anche dalle caratteristiche acquisite nel mezzo di coltura.

Una riduzione della resa di maturazione in seguito all'esposizione a nanoplastiche è stata osservata nel 2026 da Yang *et al,* [41] in oociti bovini: dopo 23 ore di maturazione *in vitro*, il gruppo esposto a particelle di polistirene di 50 nm alla concentrazione di 3 μg/mL, ha mostrato una percentuale di MII significativamente inferiore rispetto ai controlli (66,1% contro 81,0%). Gli autori, inoltre, non hanno osservato lo stesso effetto con particelle di 200 nm. Questa differenza potrebbe essere legata alla capacità delle particelle più piccole di attraversare la zona pellucida ed entrare negli oociti, mentre quelle più grandi non avevano questa capacità essendo state rilevate soltanto nelle cellule del cumulo [41]. Per approfondire il meccanismo responsabile della minore maturazione, gli autori hanno esaminato l'espressione genica dei complessi cumulo-oocita. L'analisi dei gruppi di geni suggeriva una possibile alterazione della fosforilazione ossidativa, il processo mitocondriale che permette la produzione di ATP. Tuttavia, le successive misurazioni dell'attività

metabolica e del contenuto di ATP non hanno confermato una compromissione funzionale. Yang *et al.* hanno quindi considerato anche possibili alterazioni della struttura mitocondriale, richiamando lo studio di He *et al,* [42]. In oociti suini esposti alle PS-NP durante la maturazione *in vitro*, questi ultimi hanno osservato alterazioni della morfologia dei mitocondri e una riduzione del loro potenziale di membrana, accompagnate da una compromissione della maturazione degli oociti [42].

Questo suggerisce che le nanoplastiche possano interferire con la maturazione anche attraverso alterazioni dei mitocondri. Poiché questi organelli contribuiscono a fornire l'energia necessaria ai processi della divisione meiotica, una loro compromissione potrebbe ostacolare il raggiungimento della MII. Sebbene nel nostro studio il calo percentuale osservato nel gruppo trattato non abbia raggiunto la significatività statistica, tale tendenza alla riduzione potrebbe comunque riflettere una lieve interferenza con questi processi cellulari. Tuttavia, l'entità contenuta di questa differenza suggerisce che nel presente studio tali danni siano stati parzialmente attenuati, impedendo una compromissione drastica della resa di maturazione.

Un risultato simile è stato osservato nel 2025 da Qu *et al.*, [43], i quali hanno osservato un'alterazione della maturazione ovocitaria nel modello murino. Negli oociti ottenuti da topoline esposte per 35 giorni a nanoplastiche di polistirene, gli autori hanno rilevato una ridotta progressione meiotica, accompagnata da difetti nell'organizzazione del fuso e nell'allineamento dei cromosomi. Come possibile spiegazione di queste alterazioni, hanno considerato modificazioni dell'acetilazione della tubulina, componente dei microtubuli del fuso, e dell'istone H4, coinvolto nell'organizzazione della cromatina. L'acetilazione della tubulina contribuisce alla stabilità dei microtubuli, mentre una deacetilazione insufficiente dell'istone H4 in posizione K12 (H4K12ac) è associata a difetti nell'allineamento dei cromosomi. Nel loro studio, il trattamento con melatonina aumentava l'acetilazione della tubulina e riduceva i livelli di H4K12ac: secondo gli autori, questi cambiamenti potrebbero contribuire ad attenuare il danno ovocitario causato dalle PS-NP [43].

Le nanoplastiche potrebbero quindi interferire con la maturazione anche alterando le strutture necessarie alla corretta divisione meiotica. Il fuso permette infatti la separazione dei cromosomi: difetti nella sua organizzazione o nel loro allineamento possono ostacolare il completamento della MI e il raggiungimento della MII.

Non tutti gli studi, tuttavia, hanno osservato una riduzione della percentuale di oociti che raggiungono la MII. Spinaci *et al,* nel 2025 [44], in un modello suino, non hanno rilevato

differenze nella resa di maturazione tra oociti esposti alle nanoplastiche rispetto ai controlli, pur riscontrando un aumento dei ROS intracellulari. Gli autori hanno ipotizzato che le condizioni di coltura potessero aver attenuato gli effetti dell'esposizione: il terreno conteneva infatti β-mercaptoetanolo, cisteina ed EGF, sostanze che possono favorire la maturazione e sostenere le difese antiossidanti degli oociti [44].

Le condizioni di coltura e la capacità degli oociti di contrastare gli effetti delle PS-NP potrebbero aver attenuato gli effetti dell'esposizione anche nel presente studio, contribuendo alla differenza contenuta e non statisticamente significativa nella resa di maturazione tra controllo e trattato. Questa possibilità si collega a quanto discusso inizialmente sul ruolo del terreno di coltura: le sue componenti possono modificare il comportamento delle nanoplastiche e, secondo l'ipotesi proposta da Spinaci, anche aiutare gli oociti a contrastarne gli effetti.

2.2 Internalizzazione delle nanoplastiche negli oociti

L'analisi mediante TEM ha evidenziato la presenza di nanoplastiche nel citoplasma degli oociti come dimostrato nella immagine rappresentativa riportata nella **Figura 13** in cui è visibile un raggruppamento di circa 469 nm.

L'agglomerazione di queste particelle potrebbe essere dovuta alle loro interazioni con le componenti del terreno di coltura. Come discusso nel paragrafo precedente, lo studio di Li *et al*. del 2021 sulle nanoplastiche di polistirene [39] ha mostrato che sali e proteine possono modificarne la stabilità, con effetti che variano in base alle loro caratteristiche superficiali. In particolare, hanno osservato che l'albumina può aderire alla superficie delle nanoplastiche, formando un rivestimento che ne modifica la stabilità. A seconda delle caratteristiche superficiali delle particelle e dei sali presenti, questo rivestimento può ostacolare oppure favorire l'aggregazione [39].

Per quanto riguarda l'internalizzazione delle nanoplastiche negli oociti murini, lo studio di Park *et al.,* [45] ha mostrato che le particelle di polistirene sono in grado di attraversare la zona pellucida, di accumularsi nel citoplasma e in prossimità del reticolo endoplasmatico durante la maturazione. Gli autori hanno inoltre osservato una alterazione del fuso meiotico durante l'internalizzazione, un aumento dello stress ossidativo e una riduzione dell'efficienza della sintesi proteica [45].

Quindi, la zona pellucida, pur rappresentando una barriera nei confronti di materiali estranei, non impedisce l'ingresso delle nanoplastiche nell'oocita. Questa osservazione

sostiene l'internalizzazione rilevata nel nostro studio mediante TEM: le PS-NP possono superare tale barriera e raggiungere il citoplasma. La zona pellucida non rappresenta quindi una protezione completa dall'esposizione alle nanoplastiche, che possono entrare direttamente in contatto con le strutture intracellulari.

L'internalizzazione di nanoplastiche negli oociti è stata osservata più recentemente anche da Yang *et al., nel* 2026 nel modello bovino [41]. Gli autori dello studio hanno rilevato la presenza di particelle di 50 nm nel citoplasma degli oociti, a differenza di quelle di 200 nm localizzate prevalentemente nelle cellule del cumulo [41]. Questo suggerisce quindi che le dimensioni possano influire sull'ingresso di queste particelle.

2.3 Esposizione alle nanoplastiche e stress ossidativo

L'internalizzazione delle nanoplastiche negli oociti ha suggerito la valutazione di una possibile risposta cellulare alla loro esposizione. L'analisi della fluorescenza mediante la sonda DCFH-DA ha evidenziato, nel gruppo esposto alle PS-NP, una maggiore percentuale di oociti con segnale ROS moderato o intenso. Questa osservazione suggerisce una possibile alterazione dell'equilibrio ossidativo negli oociti esposti alle PS-NP, sebbene i confronti delle intensità medie tra il gruppo di controllo e quello trattato all'interno di queste categorie non abbiano evidenziato differenze statisticamente significative.

L'osservazione della maggiore presenza di oociti con segnale ROS moderato o intenso nel gruppo trattato con PS-NP è coerente con quella di Park *et al.* [45]. Gli autori hanno rilevato negli oociti murini esposti a PS-NP, un aumento dello stress ossidativo durante la maturazione insieme all'internalizzazione delle particelle e all'aggregazione dei mitocondri nel citoplasma. Nella discussione viene richiamata, sulla base della letteratura precedente, una possibile associazione tra questa alterazione della distribuzione dei mitocondri e un'eccessiva produzione di ROS [45].

Un altro studio utile per il confronto è anche quello con Spinaci *et al*, 2025 [44]: nel loro modello *in vitro* di oociti suini, l'esposizione a nanoplastiche di polistirene ha aumentato i livelli di ROS alle concentrazioni esaminate, pur senza rilevare differenze nella percentuale di oociti che in grado di raggiungere lo stadio di MII [44].

Anche nello studio di Qu *et al.*, del 2025 [43], già discusso in relazione alla maturazione ovocitaria, l'esposizione alle nanoplastiche era associata ad un aumento dei ROS, una riduzione del contenuto di ATP e alterazioni della funzione mitocondriale [43].

Questi studi sostengono quindi l'ipotesi di un'associazione tra esposizione a nanoplastiche e aumento dello stress ossidativo negli oociti, in linea con quanto suggerito dai risultati del presente studio.

Alla luce di queste osservazioni, la maggiore presenza di oociti con segnale moderato o intenso nel gruppo trattato potrebbe essere associata ad un'alterazione della funzione mitocondriale dopo l'esposizione alle PS-NP. I mitocondri producono energia attraverso processi che comportano il trasferimento di elettroni lungo la catena respiratoria. Durante questo trasferimento, alcuni elettroni possono reagire con l'ossigeno formando ROS; un'alterazione di questi processi potrebbe aumentarne la produzione. Le osservazioni di Park e Qu suggeriscono infatti un possibile coinvolgimento dei mitocondri negli effetti dell'esposizione alle PS-NP [45, 43]. Questo meccanismo potrebbe contribuire a spiegare il segnale osservato nel presente studio, ma resta da verificare poiché non è stata valutata la funzione mitocondriale; inoltre, la sonda DCFH-DA non permette di identificare la fonte dei ROS.

La maggiore presenza di oociti trattati con segnale moderato o intenso potrebbe dipendere non solo da una maggiore produzione di ROS, ma anche da una minore capacità dell'oocita di contrastarne l'accumulo attraverso le difese antiossidanti. He *et al.* [42] hanno infatti osservato negli oociti suini esposti alle PS-NP un aumento dei ROS accompagnato da alterazioni dell'espressione dei geni SOD1, SOD2 e CAT, coinvolti nelle difese antiossidanti [42]. Questi geni codificano enzimi che contribuiscono alla trasformazione e alla rimozione delle specie ossidanti. Un'alterazione di tali sistemi potrebbe quindi favorire l'accumulo dei ROS e contribuire al segnale osservato nel nostro gruppo trattato (***Fig. 19***).

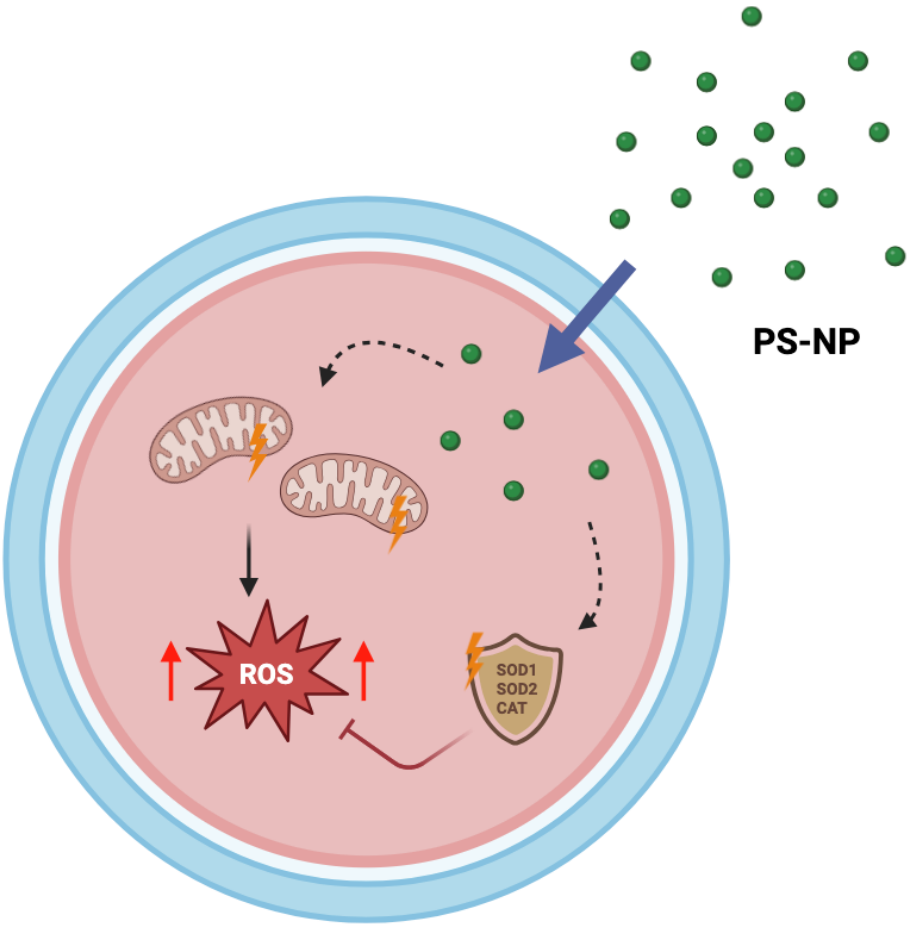


Figura 19. *Possibili meccanismi coinvolti nella risposta ossidativa degli oociti esposti alle PS-NP. Immagine realizzata con BioRender.*

CONCLUSIONI

Il presente studio ha contribuito ad approfondire i possibili effetti delle micro- e nanoplastiche sul sistema riproduttivo femminile, utilizzando il modello murino e integrando un approccio *in vivo*, finalizzato alla valutazione del tessuto ovarico, con un approccio *in vitro*, volto allo studio della risposta degli oociti all'esposizione alle nanoplastiche.

L'esposizione *in vivo* a microplastiche di polistirene ha evidenziato alterazioni della morfologia ovarica, particolarmente evidenti alla dose più elevata, caratterizzate da una maggiore disorganizzazione del parenchima e da una ridotta presenza di follicoli integri. L'analisi quantitativa ha inoltre mostrato una riduzione significativa dei follicoli primordiali, primari e pre-antrali nel gruppo esposto alla dose alta rispetto al controllo, mentre il numero di follicoli antrali è risultato significativamente ridotto in entrambi i gruppi trattati. Al contrario, non sono emerse differenze significative per i follicoli secondari e per quelli in atresia. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che l'esposizione alle microplastiche, soprattutto alla concentrazione più elevata, possa interferire con il normale mantenimento e sviluppo della popolazione follicolare.

Per quanto riguarda l'esposizione *in vitro* alle nanoplastiche di polistirene, la resa di maturazione ovocitaria è risultata lievemente inferiore nel gruppo trattato rispetto al controllo (54,5% vs 59,8%), ma la differenza non ha raggiunto la significatività statistica. Pertanto, nelle condizioni sperimentali adottate, non è possibile concludere che le nanoplastiche compromettano direttamente la capacità degli oociti di raggiungere lo stadio di metafase II.

Un dato di particolare interesse è emerso dall'analisi mediante microscopia elettronica a trasmissione, che ha evidenziato la presenza di nanoplastiche all'interno del citoplasma degli oociti, in prossimità della regione corticale. Questo risultato dimostra che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, le particelle sono in grado di raggiungere il compartimento intracellulare dell'oocita, nonostante la presenza della zona pellucida.

L'analisi dei ROS ha infine evidenziato, negli oociti esposti alle nanoplastiche, una riduzione della quota di cellule caratterizzate da segnale assente o trascurabile e un aumento della percentuale di oociti con segnale moderato o intenso. Sebbene questa distribuzione suggerisca una possibile alterazione dell'equilibrio ossidativo in seguito all'esposizione, le differenze nell'intensità media del segnale tra controllo e gruppo trattato non sono risultate statisticamente significative. I dati devono pertanto essere interpretati come un'indicazione

preliminare, che richiede ulteriori approfondimenti mediante approcci quantitativi e l'analisi di specifici sistemi di difesa antiossidante.

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano una possibile vulnerabilità del sistema riproduttivo femminile all'esposizione alle particelle di polistirene, con effetti che sembrano manifestarsi a diversi livelli: a livello tissutale, attraverso alterazioni della struttura ovarica e della popolazione follicolare, e a livello cellulare, attraverso l'internalizzazione delle nanoplastiche negli oociti e una possibile modificazione dell'equilibrio ossidativo. Tuttavia, i due modelli sperimentali non sono direttamente sovrapponibili, poiché differiscono per dimensione delle particelle, modalità e durata dell'esposizione; i risultati devono quindi essere interpretati nel contesto specifico delle condizioni sperimentali adottate.

Lo studio presenta alcuni limiti, tra cui il numero contenuto di animali utilizzati per l'analisi istologica e la variabilità osservata tra i campioni. Anche il modello *in vitro* necessita di ulteriori ottimizzazioni, considerando la resa di maturazione relativamente contenuta osservata anche nei controlli. Sarà pertanto importante, in studi futuri, ampliare il numero di campioni e di esperimenti indipendenti e approfondire i meccanismi cellulari e molecolari alla base delle alterazioni osservate, con particolare attenzione alla funzione mitocondriale, alle difese antiossidanti e alla qualità degli oociti.

Nel loro insieme, questi risultati contribuiscono a delineare un quadro ancora preliminare, ma di interesse, degli effetti delle micro e nanoplastiche sulla fisiologia ovarica e ovocitaria. Ulteriori studi saranno necessari per stabilire se le alterazioni osservate possano tradursi in una compromissione funzionale della fertilità e per chiarire la rilevanza biologica di tali effetti in condizioni di esposizione più rappresentative di quelle ambientali.

BIBLIOGRAFIA

[1] Rooda I *et al.* The adult ovary at single cell resolution: an expert review. Am J Obstet Gynecol. 2025;232: S95.e1-S95.e16.

[2] Gibson E, Mahdy H. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

[3] Waters M, Tadi P. Genetics, Female Gametogenesis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

[4] Coxir SA *et al*. From in vivo to in vitro: exploring the key molecular and cellular aspects of human female gametogenesis. Hum Cell. 2023; 36:1283-1311.

[5] Wetherall B, Madgwick S. Peculiarities of the Mammalian Oocyte Cell Cycle. Physiology (Bethesda). 2026; 41:0.

[6] Wang X *et al*. Regulation of Meiotic Prophase One in Mammalian Oocytes. Front Cell Dev Biol. 2021; 9:667306.

[7] MacLennan M *et al*. Oocyte development, meiosis and aneuploidy. Semin Cell Dev Biol. 2015; 45:68-76.

[8] Pan B, Li J. The art of oocyte meiotic arrest regulation. Reprod Biol Endocrinol. 2019; 17:8.

[9] Das M, Son WY. In vitro maturation (IVM) of human immature oocytes: is it still relevant? Reprod Biol Endocrinol. 2023; 21:110.

[10] Verlhac MH, Terret ME. Oocyte Maturation and Development. F1000Res. 2016; 5:309.

[11] Pei Z *et al*. The molecular regulatory mechanisms of meiotic arrest and resumption in oocyte development and maturation. Reprod Biol Endocrinol. 2023; 21:90.

[12] Zhang Y *et al*. Transcriptome Landscape of Human Folliculogenesis Reveals Oocyte and Granulosa Cell Interactions. Mol Cell. 2018; 72:1021-1034.e4.

[13] Salustri A. 2014. Ovogenesi e apparato genitale femminile. In: *Embriologia umana. Morfogenesi, processi molecolari, aspetti clinici* (De Felici M, Boitani C, Bouché M, Canipari R, Dolfi A, Filippini A, Musarò A, Papaccio G, editors). 2nd ed. Padova: Piccin Nuova Libraria, p. 107–122.

[14] Orozco-Galindo BV *et al.* Folliculogenesis: A Cellular Crosstalk Mechanism. Curr Issues Mol Biol. 2025; 47:113.

[15] Ezz MA, Balboula AZ. Molecular mechanisms of folliculogenesis and oogenesis. Syst Biol Reprod Med. 2026; 72:211-240.

[16] Georges A *et al.* FOXL2: a central transcription factor of the ovary. J Mol Endocrinol. 2014; 52: R17-33.

[17] Pilapitiya PGCNT, Ratnayake AS. The world of plastic waste: A review. Cleaner Materials. 2024; 11:100220.

[18] Meng J *et al.* Micro- and nano-plastic contamination in foods and potential risk to human health. Ecotoxicol Environ Saf. 2025; 303:119021.

[19] Wu P *et al.* Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics. Ecotoxicol Environ Saf. 2019; 184.

[20] Kusyk D *et al.* Micro- and Nanoplastics in the Environment: Analytical Approaches, Environmental Fate, Life Cycle, and Remediation Strategies—A Scoping Review. Molecules. 2026; 31:2789.

[21] Arif Y *et al*. Microplastics and nanoplastics: Source, behavior, remediation, and multi-level environmental impact. J Environ Manage. 2024;356.

[22] Liu H *et al*. Environmental nanoplastics induce mitochondrial dysfunction: A review of cellular mechanisms and associated diseases. Environ Pollut. 2025; 382:126695.

[23] Di Fiore C, Avino P. Microplastics and nanoplastics in the human diet. Nature Health. 2026; 1:48-57.

[24] Arellano FM *et al*. Nanoplastics in biological systems: What laboratory mechanisms reveal about real-world toxicity. J Hazard Mater. 2026; 505:141464.

[25] Chen Z *et al.* Nanoplastics are significantly different from microplastics in urban waters. Water Res X. 2023; 19:100169.

[26] Reynaud S *et al*. Nanoplastics: From model materials to colloidal fate. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2022; 57:101528.

[27] Kihara S *et al.* Reviewing nanoplastic toxicology: It's an interface problem. Adv Colloid Interface Sci. 2021; 288:102337.

[28] Wehrli L *et al*. Reproductive toxicity of micro- and nanoplastics: Insights from experimental and human studies. J Intern Med. 2025; 298:532-561.

[29] He Y, Yin R. The reproductive and transgenerational toxicity of microplastics and nanoplastics: A threat to mammalian fertility in both sexes. J Appl Toxicol. 2024; 44:66-85.

[30] Si M *et al*. Microplastics and nanoplastics in follicular fluid are associated with diminished ovarian reserve: clinical and molecular insights. J Adv Res. 2026.

[31] Huang J *et al.* Toxicity of polystyrene nanoparticles for mouse ovary and cultured human granulosa cells. Ecotoxicol Environ Saf. 2023; 249:114371.

[32] Balali H *et al*. Concerning influences of micro/nano plastics on female reproductive health: focusing on cellular and molecular pathways from animal models to human studies. Reprod Biol Endocrinol. 2024; 22:141.

[33] Ragusa A *et al.* Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. Environ Int. 2021; 146:106274.

[34] Camia B *et al*. The localization and function of the moonlighting protein Clathrin during oocyte maturation. Dev Biol. 2025; 517:1-12.

[35] Wei Z *et al.* Comparing the effects of polystyrene microplastics exposure on reproduction and fertility in male and female mice. Toxicology. 2022; 465:153059.

[36] Wu H *et al.* Polystyrene-microplastics and DEHP co-exposure induced DNA damage, cell cycle arrest and necroptosis of ovarian granulosa cells in mice by promoting ROS production. Sci Total Environ. 2023; 871:161962.

[37] Hou J *et al.* Polystyrene microplastics lead to pyroptosis and apoptosis of ovarian granulosa cells via NLRP3/Caspase-1 signaling pathway in rats. Ecotoxicol Environ Saf. 2021; 212:112012.

[38] Jeong J *et al.* Impact of polystyrene microplastics (PS-MPs) on the entire female mouse reproductive cycle: Assessing reproductive toxicity of microplastics through in vitro follicle culture. Ecotoxicol Environ Saf. 2025; 297:118228.

[39] Li X *et al.* The crucial role of a protein corona in determining the aggregation kinetics and colloidal stability of polystyrene nanoplastics. Water Res. 2021; 190:116742.

[40] Kihara S *et al.* Cellular interactions with polystyrene nanoplastics - The role of particle size and protein corona. Biointerphases. 2021; 16(4):041001.

[41] Yang J *et al.* Uptake of polystyrene nanoplastics by cumulus-oocyte complexes impairs oocyte and embryo development. Reprod Toxicol. 2026; 140:109181.

[42] He Y *et al.* Polystyrene nanoplastic exposure actives ferroptosis by oxidative stress-induced lipid peroxidation in porcine oocytes during maturation. J Anim Sci Biotechnol. 2024; 15:117.

[43] Qu J *et al.* Melatonin mitigates polystyrene nanoplastics-induced impairment of oocyte maturation in mice. Ecotoxicol Environ Saf. 2025; 305:119273.

[44] Spinaci M *et al.* Effect of polystyrene nanoplastics on in vitro maturation of pig cumulus-encosed oocytes. Res Vet Sci. 2025; 197:105949.

[45] Park S *et al.* Polystyrene nanoparticles incorporate into the endoplasmic reticulum and disturb translation during meiotic maturation in mouse oocytes. Toxicol In Vitro. 2022; 82:105380.