



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**VANESSA CAROLINA BARROS SILVA MARIOTTI**

**TOXICIDADE AO TRATO DIGESTÓRIO ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO AO  
HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D) EM RATOS**

Presidente Prudente - SP  
2021

**VANESSA CAROLINA BARROS SILVA MARIOTTI**

**TOXICIDADE AO TRATO DIGESTÓRIO ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO AO  
HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D) EM RATOS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título Mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:  
Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai

616.33  
M351t

Mariotti, Vanessa Carolina Barros Silva.

Toxicidade ao trato digestório associada à exposição ao herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) em ratos / Vanessa Carolina Barros Silva Mariotti. – Presidente Prudente, 2021.

40 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2021.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1. Trato gastrointestinal. 2. Doenças do esôfago. 3. Toxicidade crônica. I. Título.

**VANESSA CAROLINA BARROS SILVA MARIOTTI**

**TOXICIDADE AO TRATO DIGESTÓRIO ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO AO  
HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D) EM RATOS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 27 de setembro de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Profa. Dra. Karina Maria Basso  
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL –  
Londrina - PR

---

Prof. Dr. Oscar Haruo Higa  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho de conclusão de mestrado a todos os professores do curso, em especial a minha orientadora Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai.

Dedico a Dra Nilva Gali pelo incentivo e apoio para o ingresso no mestrado em Ciências da Saúde e a todos aqueles que de certa forma contribuíram para a realização desde projeto.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades que cruzaram o meu caminho nesta jornada.

Aos meus pais, esposo e toda minha família pela compreensão, incentivo e amor incondicional em todos os momentos de minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai pelo suporte, pelo carinho, pelos incentivos e pelas correções.

A instituição – UNOESTE, onde anteriormente cursei o ensino superior e me transformando em médica e agora a oportunidade de expansão do conhecimento com a pós-graduação no mestrado em Ciências da Saúde.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, meus sinceros agradecimentos.

*“Sua luta não termina quando surgir o cansaço,  
mas sim quando atingir o sucesso tão merecido”.*  
Anônimo

## RESUMO

### Toxicidade ao trato digestório associada à exposição ao herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) em ratos

**Introdução:** O herbicida diclorofenoxiacético (2,4-D) é uma auxina sintética da classe dos herbicidas clorofenoxiácidos, e foi o primeiro herbicida seletivo desenvolvido para controlar plantas dicotiledóneas ou plantas de folha larga, folhas de cultivo e ervas daninhas. É um dos herbicidas mais utilizados no mundo devido à sua aplicabilidade geral e baixo custo. A exposição humana ao 2,4-D pode ser através do contato com a pele, ingestão ou inalação, podendo apresentar danos a essa exposição. Não evidências de uma associação entre a exposição ao 2,4-D e doenças gastrointestinais. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o possível dano ao trato digestório mediante exposição crônica por via oral e inalatória ao herbicida 2,4-D em ratos. **Material e métodos:** Oitenta ratos Wistar albinos, machos e adultos, foram distribuídos em 8 grupos (n=10): I - Grupo controle inalatório: expostos à nebulização com água destilada; O - Grupo controle oral: receberam ração nebulizada com água destilada; 2,4-D LI - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D LO - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D MI - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D MO - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D HI - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D HO - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via oral. Foram utilizadas três concentrações conforme recomendação descrita na bula do produto:  $3,71 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) de 2,4-D, considerada baixa concentração;  $6,19 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de 2,4-D, considerada média concentração; e  $9,28 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de 2,4-D, considerada alta concentração. Os animais foram expostos durante 6 meses. Foram coletados esôfago, estômago e intestino delgado e grosso para análise histopatológica. **Resultados:** Um animal do grupo 2,4-D HO foi a óbito durante o estudo devido à infecção do conduto auditivo. Não houve diferença no peso dos animais e no consumo da ração ao longo do experimento entre os grupos de estudo ( $p > 0,05$ ). Hiperkeratose foi observada na maioria dos animais expostos ao 2,4-D e foi independente da via de exposição (oral ou inalatória) ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas alterações gástricas em nenhum dos animais avaliados. Somente animais expostos à média e alta concentração de 2,4-D, apresentaram displasia tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso ( $p < 0,05$ ) e esta foi de grau leve em todos os casos. **Conclusão:** A exposição crônica ao 2,4-D, independente da via e concentração de exposição, acarreta em dano ao esôfago e a média e alta concentrações apresentam potencial carcinogênico para o intestino.

**Palavras-chave:** trato gastrointestinal, doenças do esôfago, vigilância sanitária ambiental, toxicidade crônica, exposição a praguicidas.



## ABSTRACT

### **Digestory tract toxicity associated with exposure to diclorophenoxyacetic acid herbicide (2,4-D) in rats**

**Introduction:** The dichlorophenoxyacetic herbicide (2,4-D) is a synthetic auxin of the of chlorophenoxy acidic herbicides class, and was the first selective herbicide developed to control dicot plants or broadleaf plants, crop leaves and weeds. It is one of the most used herbicides in the world due to its general applicability and low cost. People can be exposed to 2,4-D through skin contact, ingestion or inhalation and damage to that exposure. There is no evidence to determine whether there is an association between exposure to 2,4-D and gastrointestinal disorders. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the possible damage to the digestive tract through chronic oral and inhalation exposure to the herbicide 2,4-D in rats. **Material and methods:** Eighty male and adult albino Wistar rats were divided into 8 groups (n = 10): I - Inhalation control group: exposed to nebulization with distilled water; O - Oral control group: received nebulized feed with distilled water; 2,4-D LI - Group exposed to low concentration of 2,4-D by inhalation; 2,4-D LO - Group exposed to low concentration of 2,4-D orally; 2,4-D MI - Group exposed to the average concentration of 2,4-D by inhalation; 2,4-D MO - Group exposed to the average concentration of 2,4-D orally; 2,4-D HI - Group exposed to high concentration of 2,4-D by inhalation; 2,4-D HO - Group exposed to high concentration of 2,4-D orally. Three concentrations were used according to the recommendation described in the product insert:  $3.71 \times 10^{-3}$  grams of active ingredient per hectare (g.a.i. / ha) of 2,4-D, considered low concentration;  $6.19 \times 10^{-3}$  g.a.i. / ha of 2,4-D, considered medium concentration; and  $9.28 \times 10^{-3}$  g.a.i. / ha of 2,4-D, considered high concentration. The animals were exposed for 6 months. Esophagus, stomach and small and large intestine were collected for histopathological analysis. **Results:** One animal in the 2,4-D HO group died during the study due to ear canal infection. There was no difference in the animals' weight and feed consumption during the experiment between the study groups ( $p > 0.05$ ). Hyperkeratosis was observed in most animals exposed to 2,4-D and was independent of the exposure route (oral or inhaled) ( $p < 0.05$ ). No gastric changes were observed in any of the animals evaluated. Only animals exposed to medium and high concentration of 2,4-D, presented dysplasia in both the small and large intestines ( $p < 0.05$ ) and this was mild in all cases. **Conclusion:** Chronic exposure to 2,4-D, regardless of the route and concentration of exposure, causes damage to the esophagus and medium and high concentrations have carcinogenic potential for the intestine.

**Keywords:** gastrointestinal tract, esophageal diseases, environmental health surveillance, chronic toxicity, exposure to pesticides.

## SUMÁRIO

<b>1 ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>10</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA - UNOESTE .....</b>	<b>29</b>
<b>ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA: DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES .....</b>	<b>30</b>

## 1 ARTIGO CIENTÍFICO

### TOXICIDADE AO TRATO DIGESTÓRIO ASSOCIADA À EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENÓXIACÉTICO EM RATOS

Vanessa Carolina Barros Silva Mariotti<sup>1,2</sup>, Isabella Zaina Ferrari Naufal<sup>2</sup>, Isadora de Almeida Ramos Amorim<sup>2</sup>, José Luiz Santos Parizi<sup>2,3</sup>, Gisele Alborghetti Nai<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup>Graduate Program in Health Science, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Faculty of Medicine of Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Pathology, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

Correspondence: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: [patologia@unoeste.br](mailto:patologia@unoeste.br)

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: *Digestive Diseases and Sciences*, Fator de impacto 2.937, Classificação Qualis A3.

## Resumo

**Introdução** O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida e é o segundo mais utilizado no mundo em várias lavouras. Fatores ambientais, principalmente os relacionados à dieta, são importantes no risco de desenvolvimento de câncer do trato gastrintestinal. Não existem evidências para determinar se existe uma associação entre a exposição ao 2,4-D e efeitos no trato digestório.

**Objetivos** O objetivo deste estudo foi avaliar o possível dano ao trato digestório mediante exposição crônica por via oral e inalatória ao herbicida 2,4-D em ratos.

**Métodos** Oitenta ratos Wistar albinos, machos e adultos, foram distribuídos em 8 grupos (n=10), dois grupos expostos por via inalatória e oral a água destilada (grupos controles) e 6 grupos expostos por via oral e inalatória a três diferentes concentrações de 2,4-D [ $3,71 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha);  $6,19 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha; e  $9,28 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha]. Os animais foram expostos durante 6 meses, exposição inalatória 5 dias da semana e a oral a cada 2 dias. Foram coletados esôfago, estômago e intestino delgado e grosso para análise histopatológica.

**Resultados** Os animais expostos ao 2,4-D apresentaram hiperqueratose do esôfago, independente da via. Os animais expostos a maior concentração de 2,4-D por via oral apresentaram displasia leve do intestino grosso. No intestino delgado, a maioria dos animais expostos à média e alta concentração de 2,4-D apresentou displasia leve. Não foram observadas alterações gástricas em todos os grupos estudados.

**Conclusões** A exposição crônica ao 2,4-D, principalmente a média e alta concentração, independente da via, causa lesão reativa no esôfago e lesão pré-neoplásica no intestino.

**Palavras-chave** Trato gastrointestinal, Doenças do esôfago, Vigilância sanitária ambiental, Toxicidade crônica, Exposição a praguicidas.

## Introdução

Há muitas décadas vem se utilizando agrotóxicos para controle de pragas e ervas daninhas para auxiliar o crescimento e desenvolvimento de plantações e pastagens [1]. O uso generalizado de pesticidas na agricultura seja para eliminar pragas ou para regular o crescimento das culturas tem importantes efeitos toxicológicos. Intoxicações de animais ou de seres humanos com tais agentes podem ocorrer após exposição no solo, ar, água ou colheitas, ou após o não cumprimento das instruções de segurança [1].

O herbicida diclorofenoxiacético (2,4-D) é uma auxina sintética da classe dos herbicidas clorofenoxiácidos, e foi o primeiro herbicida seletivo desenvolvido para controlar plantas dicotiledóneas ou plantas de folha larga, folhas de cultivo e ervas daninhas [2]. O 2,4-D vem sendo comercializado desde 1944 e é um dos herbicidas mais utilizados no mundo devido à sua aplicabilidade geral e baixo custo [2]. Existem mais de 600 produtos contendo 2,4-D atualmente no mercado e é encontrado, por exemplo, em misturas comerciais de herbicidas para gramado [3]. Além disso, 2,4-D apresenta um longo tempo de atividade residual em solos e águas, persistindo por vários meses nestes, devido à sua baixa atividade microbiológica [3], o que possibilita a contaminação de seres humanos e animais ao longo do tempo.

Durante a Guerra do Vietnã, nas décadas de 50 a 70, o 2,4-D foi utilizado pela força aérea norte-americana como agente desfolhante, junto com o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e o pentaclorofenol (PCF), formando o “Agente laranja” [5]. Desde meados da década de 1990, pesquisadores coreanos têm investigado questões de saúde relacionadas ao “Agente Laranja”. Como já se passaram décadas desde que as unidades militares coreanas se retiraram do Vietnã, a investigação tardia desse herbicida apresenta alguns desafios. Porém, alguns trabalhos revelaram que a alta exposição ao “Agente Laranja” foi associada a uma prevalência significativamente maior de cânceres (câncer de cólon, leucemia e mieloma múltiplo), doenças circulatórias (hipertensão, infarto cerebral e periférico vasculopatia), doenças neuro-musculares (neuropatia periférica, paralisia de múltiplos nervos e esclerose múltipla), doenças de pele e dislipidemia [5].

Um estudo de coorte da *International Agency for Research on Cancer (IARC)* envolvendo trabalhadores de produção e pulverizadores de fenoxi-herbicida e clorofenol, encontrou menos doenças do sistema digestivo e mortalidade por cirrose

em trabalhadores expostos do que em controles não expostos. Os resultados de mortalidade até 2001 para a coorte Seveso, na Itália, não mostrou aumento de mortes relacionadas a doenças digestivas ou especificamente à cirrose em expostos ao 2,4-D. Vários estudos de mortalidade de várias coortes ocupacionais de pessoas expostas ao 2,4-D foram inconsistentes, mas geralmente não evidenciaram aumento significativo nas mortes por úlceras ou cirrose [6]. Os relatos têm sido inconsistentes, e a interpretação de estudos individuais é difícil devido à falta de informações sobre o consumo de álcool e outros fatores de risco. Nos estudos que mostraram a associação mais forte entre exposição ao 2,4-D e doença gastrointestinal (especificamente cirrose), não foi excluída a exposição ao álcool [6].

Em vista das inconsistências observadas para determinar se existe uma associação entre a exposição ao 2,4-D e doenças gastrointestinais, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível dano ao trato digestório mediante exposição crônica por via oral e inalatória ao herbicida 2,4-D em ratos, simulando a exposição ambiental (ocupacional e não ocupacional) a concentrações semelhantes da exposição humana.

## **Métodos**

### **Protocolo animal**

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 80 ratos Wistar albinos, machos, adultos (idade inicial de 90 dias), com peso entre 200-250g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), alocados em gaiolas plásticas grandes, a temperatura média de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro).

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos (n=10):

- I - Grupo controle inalatório: expostos à nebulização com água destilada;
- O - Grupo controle oral: receberam ração nebulizada com água destilada;
- 2,4-D LI - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via inalatória;
- 2,4-D LO - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via oral;

- 2,4-D MI - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via inalatória;
- 2,4-D MO - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via oral;
- 2,4-D HI - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via inalatória;
- 2,4-D HO - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via oral.

### **Protocolo de exposição ao herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D)**

A exposição ao herbicida ácido diclorofenóxiacético foi feita com 2,4-D (Nortox S.A., Arapongas, Paraná, Brasil), com a seguinte composição descrita na bula: sal de dimetilamina de (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D): 806g/litro (80,6% m/v), equivalente acid de 2,4D: 670g/litro (67,0% m/v) e ingredientes inertes: 424g/litro (42,4% m/v).

Foram utilizadas três concentrações conforme recomendação descrita na bula do produto, as quais foram ajustadas ao tamanho da caixa para nebulização:  $3,71 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) de 2,4-D (correspondendo a 20,69 ppm), considerada baixa concentração;  $6,19 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de 2,4-D (correspondendo a 34,63 ppm), considerada média concentração; e  $9,28 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de 2,4-D (correspondendo a 51,66 ppm), considerada alta concentração.

Para a nebulização foram utilizadas duas caixas (32x 24x 32 cm), uma para os grupos controles e outra para os grupos expostos ao 2,4-D. Cada caixa foi ligada a um nebulizador ultrassônico (Pulmosonic Star<sup>®</sup>, Soniclear Ind. Com. Imp. e Exp. Ltda., São Paulo, Brasil) [7]. A exposição dos animais e da ração foi realizada até que toda a solução fosse nebulizada (aproximadamente 15 minutos).

Os animais expostos por via inalatória foram nebulizados diariamente, por cinco dias consecutivos durante a semana. A ração dos animais expostos por via oral foi nebulizada um dia antes de ser ofertada e trocada a cada dois dias. A ração residual foi pesada a cada troca para controle da ingesta pelos animais.

Os animais foram pesados mensalmente até o final do experimento.

Os animais de todos os grupos foram expostos durante 6 meses. A eutanásia foi realizada ao final do experimento com Tiopental sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg de peso via peritoneal [8].

### **Avaliação histopatológica**

Após a eutanásia, foram retirados o esôfago, estômago e intestino delgado e grosso de cada animal. Os fragmentos retirados foram fixados em formol a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas e submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil).

Foram obtidos de cada órgão cinco cortes de 5 $\mu$ M por um micrótomo LEICA RM2265 (Leica Biosystems Nussoch GmbH, Alemanha) e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil).

A análise histopatológica dos grupos foi cega, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão). Os parâmetros gerais avaliados no esôfago, estômago e intestino delgado e grosso com seus respectivos escores foram: infiltrado inflamatório intersticial (0=ausente, 1=leve, 2=moderada, 3=intensa) e tipo de célula inflamatória presente (polimorfonucleares e/ou mononucleares); congestão tecidual (0=ausente, 1=leve, 2=moderada, 3=intensa); necrose tecidual (0=ausente; 1=presente e focal, 2=presente e difusa); necrose vascular (0=ausente, 1=presente); alterações não neoplásicas da mucosa (atrofia, hiperplasia; 0=ausente, 1=presente); lesões displásicas (0=ausente, 1=displasia leve, 2= displasia moderada, 3= displasia grave) e presença de lesões neoplásicas benignas e malignas (0=ausente, 1=benigna, 2=maligna) [9].

Também foram analisados especificamente, os seguintes parâmetros [9]: esôfago: hiperkeratose (definida como aumento da camada córnea) (0=ausente, 1=presente), parakeratose (definida como maturação anormal do epitélio escamoso com presença de células nucleadas na camada córnea) (0=ausente, 1=focal, 2=difusa), metaplasia (0=ausente, 1=focal, 2=difusa); intestino delgado e grosso: hiperplasia linfóide (0=ausente, 1=presente).

### **Análise morfométrica do esôfago**

- Medida da espessura do epitélio do esôfago: foram realizadas medidas em duas áreas do epitélio por secção histológica, utilizando-se o software ImageJ<sup>®</sup> (*National Institute of Health* (NIH) dos Estados Unidos, disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) [9];
- Contagem de NORs (regiões organizadoras de nucléolos) no esôfago: cortes desparafinizados foram corados com impregnação por prata e contracorados com Van Gieson (“verde luz”) (Merck, Darmstadt,



Alemanha), segundo a técnica de Ploton et al. [10] e foram avaliados 100 núcleos por animal [10].

### **Análise estatística**

As variáveis qualitativas foram analisadas com a Razão de Verossimilhança. As variáveis peso e consumo de ração apresentaram homogeneidade das variâncias (teste de Levene,  $p > 0,05$ ) e foram analisadas com uma Análise de Variância. A variável espessura do epitélio apresentou distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0,05$ ) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene,  $p > 0,05$ ) e foi analisada com uma Análise de Variância, seguida do teste Diferença Mínima Significativa para as comparações múltiplas. A variável número de NORs não apresentou normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov,  $p < 0,05$ ) e nem homogeneidade das variâncias (teste de Levene,  $p < 0,05$ ) e então foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar os postos da distribuição, seguido do teste de Dunn para as comparações múltiplas. Essas variáveis foram correlacionadas com a correlação não paramétrica de Spearman. Para verificar a concordância entre a displasia no intestino grosso e delgado, foi utilizado o coeficiente de concordância de Kappa. O tamanho do efeito também foi avaliado pelo  $d$  de Cohen, onde valores  $<0,19$  são considerados insignificantes, entre  $0,20-0,49$  são considerados pequenos, entre  $0,50-0,79$  médio, entre  $0,80-1,29$  grande e  $> 1,30$  muito grande [11].

Os dados foram processados com o SPSS 23.0. Todos os testes estatísticos foram ao nível de 5%.

### **Resultados**

Um animal do grupo 2,4-D HO foi a óbito durante o estudo devido à infecção do conduto auditivo.

#### **Peso dos animais e consumo de ração**

Não houve diferença no peso dos animais e no consumo da ração ao longo do experimento entre os grupos de estudo ( $p > 0,05$ ).

#### **Esôfago**

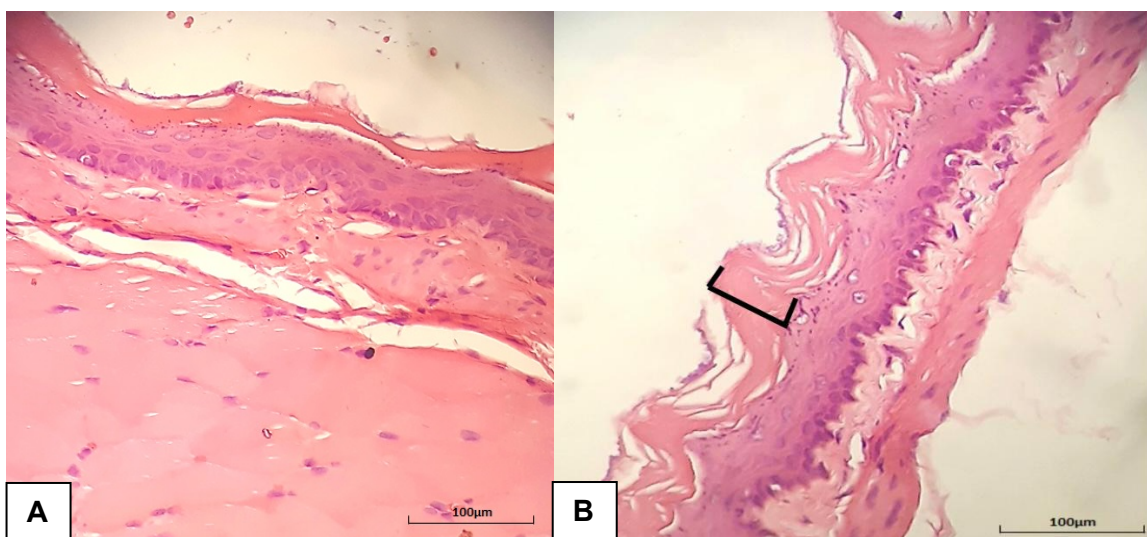
Não foram observadas congestão, inflamação, necrose tecidual, necrose vascular, atrofia, hiperplasia, metaplasia, paraceratose e lesões displásicas ou neoplásicas em nenhum dos animais avaliados.

Hiperkeratose foi observada na maioria dos animais expostos ao 2,4-D e foi independente da concentração do herbicida e da via de exposição (oral ou inalatória) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** Incidência de hiperkeratose no epitélio do esôfago nos diferentes grupos experimentais (n=79).

Grupos	Hiperkeratose	Grupos	Hiperkeratose
I	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>	O	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>
2,4-D LI	8/10 (80%) <sup>Ab</sup>	2,4-D LO	8/10 (80%) <sup>Ab</sup>
2,4-D MI	7/10 (70%) <sup>Ab</sup>	2,4-D MO	10/10 (100%) <sup>Ab</sup>
2,4-D HI	10/10 (100%) <sup>Ab</sup>	2,4-D HO	9/9 (100%) <sup>Ab</sup>

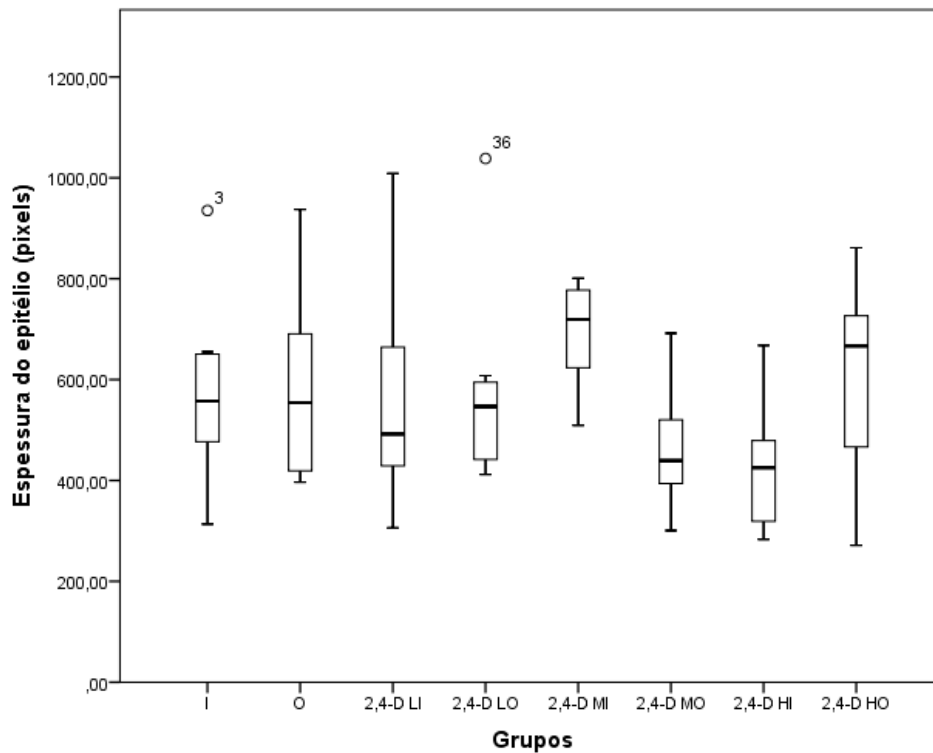
Grupos: I - Grupo controle inalatório; O - Grupo controle oral; 2,4-D LI - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D LO - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D MI - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D MO - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D HI - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D HO - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via oral. Letras maiúsculas comparam grupos na mesma linha. Letras minúsculas comparam os grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras diferentes significam  $p < 0,05$ , onde  $a \neq b$ .



**Fig. 1** Fotomicroscopia do esôfago. A – Epitélio normal (animal do grupo I). B – Notar aumento da espessura da camada córnea (hiperkeratose) (animal do grupo 2,4-D LI). Hematoxilina-eosina, aumento de 100x. Barra de escala: 100µm.

### Medida da espessura do epitélio do esôfago

A espessura epitelial média do esôfago nos grupos não expostos foi de  $575,81 \pm 176,95$  pixels, e nos grupos expostos ao 2,4-D foi de  $546,51 \pm 174,31$  pixels. Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos 2,4-D MI x 2,4-D HI e 2,4-D MI x 2,4-D MO e entre 2,4-D HI x 2,4-D HO ( $p < 0,05$ ), sendo que os animais dos grupos 2,4-D MO e 2,4-D HI apresentaram as menores médias (Figura 2). Com um  $d$  de Cohen de 0,0166823, os animais expostos mostraram uma diferença insignificante daqueles não expostos ao 2,4-D para a espessura epitelial.

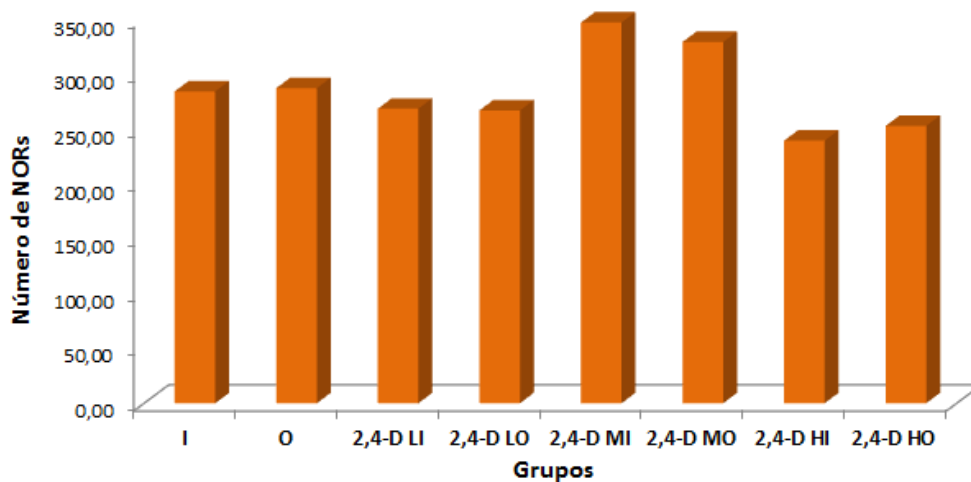


**Fig. 2** Medida da espessura do epitélio do esôfago (em pixel) nos diferentes grupos experimentais ( $n=79$ ) ( $p < 0,05$ : 2,4-D MI x 2,4-D HI; 2,4-D MI x 2,4-D MO; 2,4-D HI x 2,4-D HO). °: *outlier* e número do animal. Grupos: I - Grupo controle inalatório; O - Grupo controle oral; 2,4-D LI - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D LO - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D MI - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D MO - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D HI - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D HO - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via oral.

### Contagem de regiões organizadoras de nucléolos (NORs)

Houve diferença estatística significativa entre os postos dos grupos 2,4-D MI x 2,4-D HI e entre 2,4-D MO x 2,4-D HO ( $p < 0,05$ ), onde os grupos expostos à média concentração apresentaram maior contagem de NORs do que os expostos à alta concentração do 2,4-D (Figura 3).

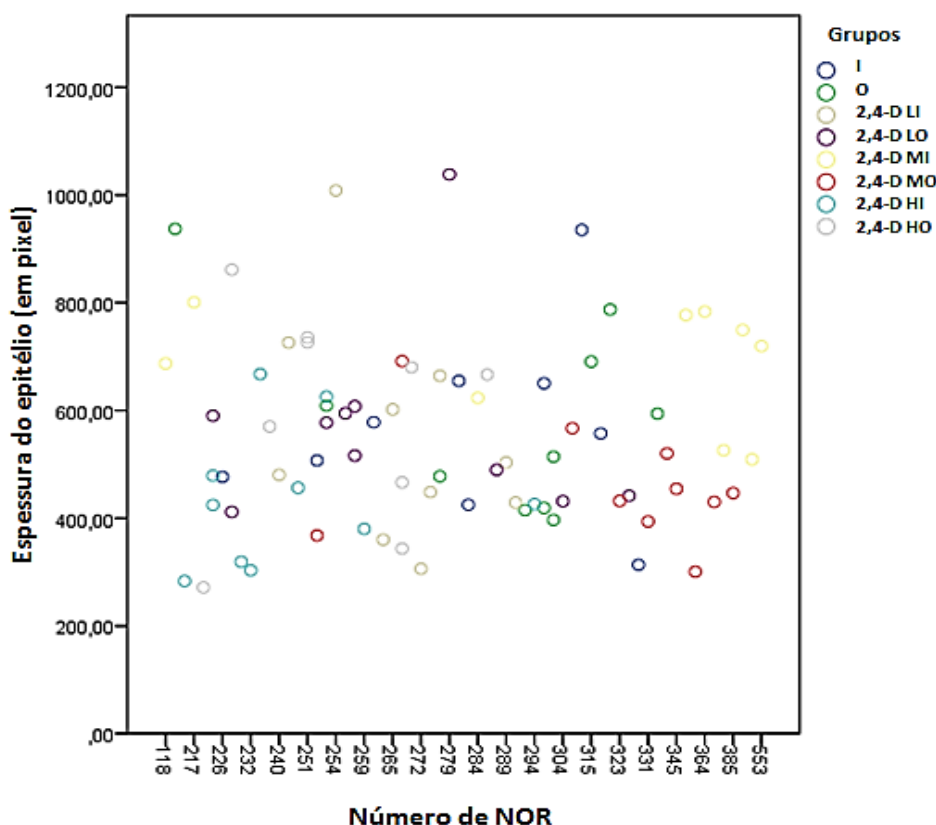
O número médio de NORs no epitélio do esôfago dos grupos não expostos foi  $285,68 \pm 39,29$ , e dos grupos expostos ao 2,4-D foi  $282,97 \pm 67,38$ . Com um  $d$  de Cohen de 0,049136, os animais expostos mostraram uma diferença insignificante daqueles não expostos ao 2,4-D em sua contagem de NOR.



**Fig. 3** Média do número de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) no epitélio do esôfago nos diferentes grupos experimentais ( $n = 79$ ) ( $p < 0,05$ : 2,4-D MI x 2,4-D HI; 2,4-D MO x 2,4-D HO). Grupos: I - Grupo controle inalatório; O - Grupo controle oral; 2,4-D LI - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D LO - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D MI - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D MO - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D HI - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D HO - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via oral.

#### *Correlação entre a medida da espessura do epitélio e a contagem de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) no esôfago*

Não houve correlação entre a medida da espessura do epitélio e a contagem de NORs no esôfago ( $\rho = -0,010$ ;  $p = 0,934$ ) (Figura 4).



**Fig. 4** Correlação entre a espessura epitelial (em pixel) e o número de regiões organizadoras do nucléolo (NORs) (por mm<sup>2</sup>) no epitélio do esôfago nos diferentes grupos experimentais ( $p = 0,934$ ). Grupos: I - Grupo controle inalatório; O - Grupo controle oral; 2,4-D LI - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D LO - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D MI - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D MO - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D HI - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D HO - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via oral.

### Estômago

Não foram observadas alterações gástricas em nenhum dos animais avaliados.

### Intestino

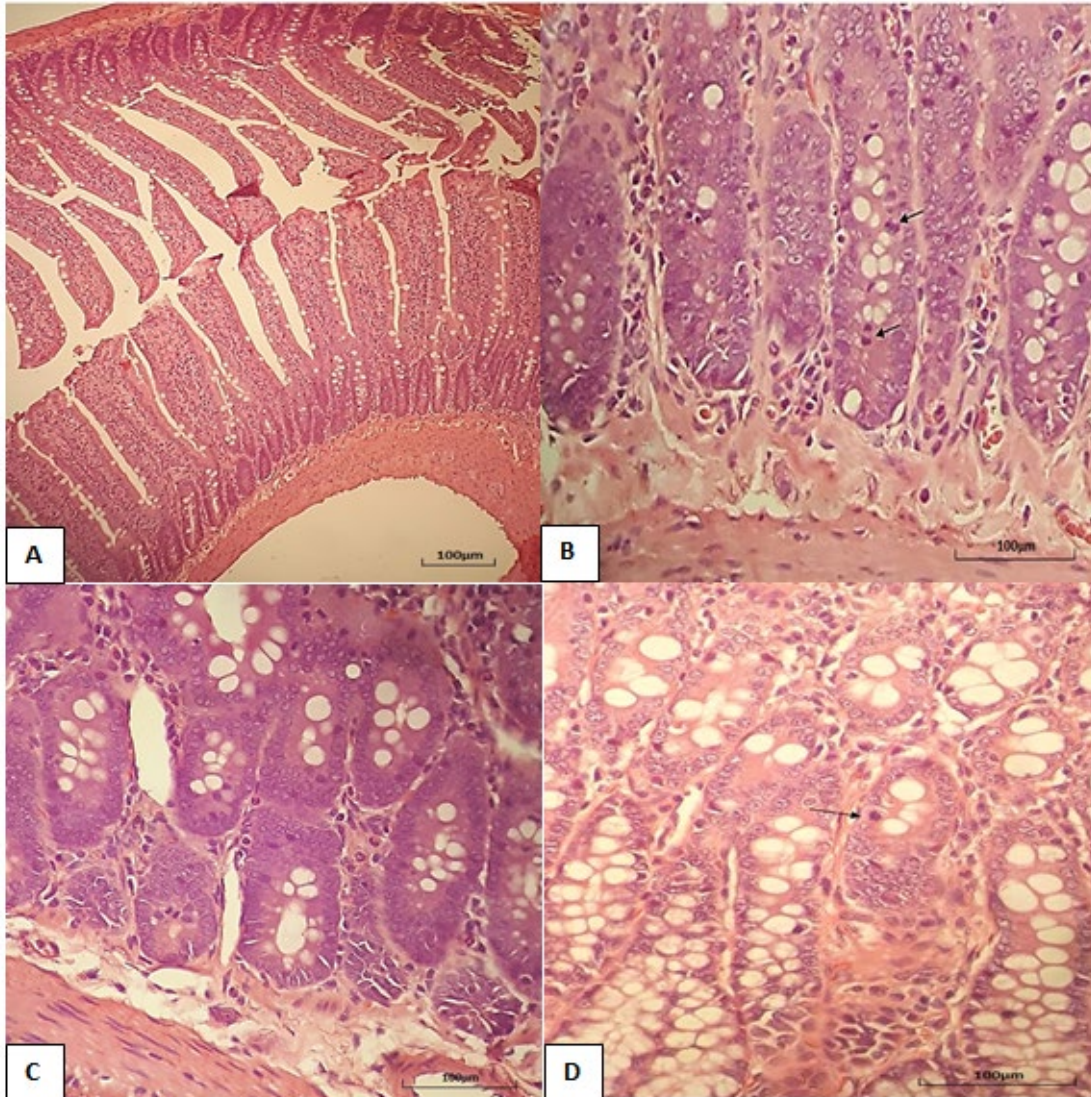
Não foram observadas congestão, inflamação, necrose tecidual, necrose vascular, atrofia ou hiperplasia do epitélio, hiperplasia linfóide e lesões neoplásicas em nenhum dos animais avaliados tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso.

Os animais expostos à média e alta concentração de 2,4-D apresentaram displasia leve tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso ( $p < 0,05$ ), com maior incidência nos animais expostos a alta concentração por via oral ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2, Figura 5). Houve maior incidência de displasia leve no intestino delgado do que no intestino grosso nos animais expostos a média concentração (oral e inalatória), porém o coeficiente Kappa mostrou que essas proporções são iguais entre o delgado e o grosso. Não se observou displasia moderada ou severa em nenhum dos animais avaliados.

**Tabela 2** Incidência de displasia leve no intestino delgado e grosso nos diferentes grupos experimentais (n=79).

<b>Intestino delgado</b>			
<b>Grupos</b>	<b>Displasia leve</b>	<b>Grupos</b>	<b>Displasia leve</b>
<b>I</b>	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>	<b>O</b>	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>
<b>2,4-D LI</b>	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>	<b>2,4-D LO</b>	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>
<b>2,4-D MI</b>	2/10 (20%) <sup>Ab</sup>	<b>2,4-D MO</b>	8/10 (80%) <sup>Ab</sup>
<b>2,4-D HI</b>	4/10 (40%) <sup>Ac</sup>	<b>2,4-D HO</b>	9/9 (100%) <sup>Ab</sup>
<b>Intestino grosso</b>			
<b>Grupos</b>	<b>Displasia leve</b>	<b>Grupos</b>	<b>Displasia leve</b>
<b>I</b>	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>	<b>O</b>	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>
<b>2,4-D LI</b>	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>	<b>2,4-D LO</b>	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>
<b>2,4-D MI</b>	0/10 (0%) <sup>Aa</sup>	<b>2,4-D MO</b>	2/10 (20%) <sup>Ab</sup>
<b>2,4-D HI</b>	5/10 (50%) <sup>Ab</sup>	<b>2,4-D HO</b>	8/9 (88,9%) <sup>Ac</sup>

Grupos: I - Grupo controle inalatório; O - Grupo controle oral; 2,4-D LI - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D LO - Grupo exposto à baixa concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D MI - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D MO - Grupo exposto à média concentração de 2,4-D por via oral; 2,4-D HI - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via inalatória; 2,4-D HO - Grupo exposto à alta concentração de 2,4-D por via oral. Letras maiúsculas comparam grupos na mesma linha. Letras minúsculas comparam os grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras diferentes significam  $p < 0,05$ , onde  $A \neq B$  e  $a \neq b$ ;  $b \neq a$ ;  $c \neq a$ ,  $b$ .



**Fig. 5** Fotomicroscopia do intestino delgado: A – Mucosa de padrão normal (Animal do grupo I). B – Mucosa com displasia leve. Observar nucléolos evidentes e várias figuras de mitose (setas) (Animal do grupo 2,4-D MI). Fotomicroscopia do intestino grosso: C – Mucosa de padrão normal (Animal do grupo I). D – Mucosa com displasia leve. Observar núcleos vesiculosos com nucléolos evidentes e figura de mitose atípica (seta) (Animal do grupo 2,4-D MO). Em A, Hematoxilina-eosina, aumento de 100x. Em B, C e D, Hematoxilina-eosina, aumento de 400x. Barra de escala: 100µm.

## Discussão

No presente estudo, observamos hiperqueratose esofágica na maioria dos animais expostos ao 2,4-D (independente da via ou concentração). Os animais

expostos à média e alta concentração de 2,4-D apresentaram displasia leve intestinal, a qual predominou nos expostos por via oral. Não foram observadas alterações histopatológicas gástricas em nenhum dos animais expostos ao 2,4-D.

Segundo a Entidade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority* – EFSA) [12], analisando os dados referentes às amostras de alimentos provenientes da União Europeia, 43,4% continham resíduos de agrotóxicos dentro do permitido e 1,5% excederam os limites permitidos para as concentrações de agrotóxicos nos alimentos. Assim, embora a via inalatória seja a mais comum de exposição aos agrotóxicos, analisar os efeitos da ingestão de alimentos contaminados por agrotóxicos também é importante. Por isso em nosso estudo avaliamos tanto a exposição por via inalatória (mais comum na exposição ocupacional) quanto por via oral (ingestão de ração contaminada).

Os epitélios da mucosa oral e da mucosa esofágica são do mesmo tipo. Ambos são epitélios pavimentosos estratificados não queratinizados [13]. Em um estudo com ratos expostos cronicamente ao 2,4-D por via oral e inalatória, foi observada hiperqueratose do dorso da língua somente nos animais expostos por via oral e à alta concentração [14]. Hiperqueratose da língua, lábios e mucosa bucal também foram observadas em um estudo que avaliou trabalhadores que fabricavam herbicidas da classe dos clorofenóxicos, a qual o 2,4-D pertence [15]. Em nosso estudo, hiperqueratose foi encontrada no epitélio esofágico da maioria dos animais expostos ao 2,4-D independente da dose e via de exposição. A hiperqueratose é o espessamento do estrato córneo dos epitélios pavimentosos estratificados, onde observamos um aumento da queratinização destes epitélios. A hiperqueratose é uma alteração adaptativa a uma agressão constante do epitélio por agentes físicos ou químicos [12]. Nossos achados mostram que o 2,4-D agride o epitélio esofágico suscitando resposta adaptativa e que a agressão é independente da concentração e da via de exposição, diferenciando-o do epitélio bucal.

Enquanto estudos realizados com roedores avaliando a cavidade bucal, tanto mediante exposição aguda inalatória [16] quanto exposição crônica por via oral e inalatória [14] mostram um aumento da espessura do epitélio da língua, principalmente com o aumento da concentração do 2,4-D, o nosso avaliando o esôfago não mostrou aumento de espessura do epitélio. Possivelmente, isto tenha ocorrido por um maior dano causado ao epitélio esofágico, com maior morte celular e mesmo ocorrendo hiperqueratose, não houve aumento da espessura do epitélio.



Outro dado que corrobora esta hipótese é que os animais expostos à alta concentração de 2,4-D, independente da via, apresentaram as menores contagens de NORs (que é um marcador da proliferação celular [14]). Este nosso dado também contrasta com os dados de outro estudo, onde a exposição crônica a altas concentrações do 2,4-D foi associada ao aumento de NORs na língua de ratos expostos cronicamente a este herbicida [14]. A cavidade bucal apresenta um fator de proteção aos agentes químicos que é a limpeza do tecido proporcionada pela liberação de saliva pelas glândulas salivares, o que pode justificar a diferença observada em nosso estudo com o estudo da cavidade bucal dos ratos expostos ao 2,4-D com relação à presença de hiperqueratose, alteração da espessura do epitélio e número de NORs. Nossos dados mostram que o 2,4-D é mais agressivo ao epitélio do esôfago mediante exposição crônica, independente da via, e estimula um padrão de resposta adaptativa à agressão diferente ao observado no epitélio bucal dos ratos expostos, pois no esôfago não houve aumento da medida da espessura do esôfago e não houve aumento número da contagem de NORs diferente dos achados na cavidade bucal.

Em um estudo com 114.562 veteranos da Guerra do Vietnã, utilizando um questionário de doenças auto-referidas, mostrou que a alta exposição ao “Agente Laranja” foi associada a uma prevalência significativamente maior de câncer, entre eles o de cólon. Neste mesmo estudo, houve uma percepção aumentada para várias outras doenças, como doenças circulatórias, respiratórias e digestivas. Entre as doenças digestivas, são citadas gastrite, úlcera péptica, enterocolite, cálculos biliares, cirrose e hepatite crônica, mas os autores ressaltam que estes resultados devem ser interpretados com cuidado [17]. Em outro estudo que faz parte do *Korean Veterans Health Study*, que analisou morbidade e mortalidade de 2.051.098 pessoas que prestaram o serviço militar no Vietnã, constatou-se que a exposição ao “Agente Laranja” esteve associada a aumento significativo de risco para câncer de estômago e intestino delgado, mas não para câncer de esôfago. Porém estas neoplasias foram relacionadas à exposição 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD), um conhecido carcinógeno humano, que era um contaminante do 2,4,5-T, o qual é um dos componentes do “Agente Laranja”, juntamente com o 2,4-D [5]. O 2,4-D foi considerado como sendo do grupo 2B (evidências limitadas de carcinogenicidade para humanos) pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) [18]. No presente estudo não observamos alterações gástricas, nem inflamatórias nem

neoplásicas, assim como também não observamos displasia ou neoplasia esofágica. Isto mostra que provavelmente estas alterações estejam mais relacionadas a outros componentes do “Agente Laranja” e não ao 2,4-D. Entretanto, observamos lesões displásicas no intestino delgado e grosso, que embora de grau leve, mostram potencial carcinogênico do 2,4-D para este órgão. Embora, não tenhamos observado diferença estatística entre a incidência de lesões displásicas no intestino delgado e grosso nas diferentes concentrações e vias utilizadas, o aparecimento de lesões displásicas no intestino delgado já a partir da exposição à média concentração, sugere que este pode ser mais susceptível do que o intestino grosso ao 2,4-D.

Os efeitos do 2,4-D sobre o sistema imunológico são controversos, sendo que alguns estudos mostram que este herbicida pode ter efeitos imunossupressores e outros um efeito estimulador da proliferação de linfócitos [19]. Em um estudo avaliando o tecido linfoide intramural intestinal de camundongos que foram tratados com o imunossupressor azatioprina e com 2,4-D, observou-se efeito imunossupressor semelhante entre as duas substâncias e potencialização do efeito da azatioprina quando usada simultaneamente ao 2,4-D [20]. Em nosso estudo não observamos inflamação nem hiperplasia linfoide tanto no intestino delgado quanto no grosso, provavelmente porque utilizamos concentrações menores de 2,4-D em nosso estudo comparado a de estudo anteriores, o que não foi suficiente para estimular imunorreatividade.

Com os dados de nosso estudo, concluímos que a exposição crônica ao 2,4-D mediante concentrações habitualmente utilizadas em lavouras, tanto por via oral quanto inalatória, acarreta em hiperkeratose do esôfago e displasia leve do intestino delgado e grosso. As concentrações média e alta de 2,4-D mostraram-se mais agressiva para o esôfago e intestino e a via oral mais danosa ao intestino.

**Agradecimentos** Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira, pelo processamento histológico dos espécimes.

**Financiamento** Este estudo foi financiado por fundos de pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE).

## Conformidade com os padrões éticos

**Conflito de interesses** Os autores declaram não haver conflito de interesse.

**Aprovação ética** Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) (Protocolo nº 6032) (Anexo A) e desenhado e monitorado de acordo com as diretrizes ARRIVE [21].

## Referências

1. Mello FA, Fagiani MAB, Silva RCR, et al. Pesticides: impacts to the environment and human health. *Colloquium Vitae* 2019; 11: 37-44. <http://dx.doi.org/10.5747/cv.2019.v11.n2.v262>.
2. Environmental Protection Agency (EPA). *2,4-D Technical fact sheet*. Washington: US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs. U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2011. Available at: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html> Accessed Jan 29, 2021.
3. Reregistration Eligibility Decision (RED) 2,4-D; *EPA 738-R-05-002*; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2005.
4. Dakhkhni TH, Raouf GA, Qusti SY. Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2, 4-D on rat hepatocytes: an FT-IR spectroscopic study. *Eur Biophys J*. 2016;45(4):311-320. <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-015-1097-7>.
5. Yi SW, Ohrr H. Agent Orange exposure and cancer incidence in Korean Vietnam veterans: a prospective cohort study. *Cancer*. 2014;120(23):3699-3706. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.28961>.
6. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Population Health and Public Health Practice; Committee to Review the Health Effects in Vietnam Veterans of Exposure to Herbicides (Eleventh Biennial Update). *Veterans and Agent Orange: Update 11* (2018). Washington (DC): National Academies Press (US); 2018 Nov.

- Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30629395> Accessed 11 Jan, 2019.
7. Mello FA, Quinallia G, Marion AL, et al. Evaluation of the nasal cavity mice submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)*. 2018;51(4): 247-253. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p00-00>
  8. Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS. *Curso de Manipulação de Animais de Laboratório*. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2005. Available at: [http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha\\_manipulacao.pdf](http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf). Accessed 22 Ago, 2015.
  9. Nai GA, Gonçalves Filho MA, Estrella MPS, et al. Study of the influence of the pH of water in the initiation of digestive tract injury in cadmium poisoning in rats. *Toxicol Rep*. 2015;2:1033-1038. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.07.012>. eCollection 2015.
  10. Ploton D, Menager M, Jeannensson P, et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region of the optical level. *Histochem J*. 1986; 18:5-14.
  11. Espírito-Santo H, Daniel F. Calculating and reporting effect sizes on scientific papers (1):  $p < 0.05$  limitations in the analysis of mean differences of two groups. *Port J Behav Soc Res* 2015; 1(1):3-16.
  12. European Food Safety Authority (EFSA). *Chemicals in food 2016*. Italy. 2016. Available at: [https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/161215chemicalsinfoodreport.pdf](https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/161215chemicalsinfoodreport.pdf). Accessed 21 Ago, 2020.
  13. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Digestive Tract Pathology. Esophagus*. In: Robbins and Cotran: Pathology: pathological bases of diseases. Chapter 17. pp. 757-763. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2016.
  14. Parizi JLS, Odorizzi GASM, Sato GMRH, et al. Oral mucosa changes associated with chronic oral and inhalation exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in Wistar rats. *Toxicol Res*. 2020; 9(6): 746-757. <http://dx.doi.org/10.1093/toxres/tfaa085>.

15. Chemikosova TS, Kamalova OA, Ibragimova ZN. Status of the buccal mucosa in subjects occupationally exposed to chlorophenoxyherbicides. *Stomatologiya (Mosk)* 2004; 83:14-18.
16. Parizi JLS, Tolardo AJ, Lisboa ACG, et al. Evaluation of buccal damage associated with acute inhalation exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in mice. *BMC Vet Res.* 2020; 16(1):244. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-020-02461-w>.
17. Yi SW, Ohrr H, Hong JS, et al. Agent Orange exposure and prevalence of self-reported diseases in Korean Vietnam veterans. *J Prev Med Public Health.* 2013;46(5):213-225. <http://dx.doi.org/10.3961/jpmph.2013.46.5.213>.
18. International Agency for Research on Cancer (IARC). *Chlorophenoxy herbicides (Group 2B)*. Monographs supplement 7. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer. 1987. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK533638/> Accessed 09 Nov, 2020.
19. International Agency for Research on Cancer (IARC). *DDT, Lindane, and 2,4-D*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2015. Volume 113. IARC, Lyon. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol113/index.php>. Accessed 14 Jan, 2019.
20. Sapin MR, Lebedeva SN, Zhamsaranova SD, et al. Comparative analysis of disorders in duodenal lymphoid tissue of mice treated with azathioprine and herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and their correction by plant and animal origin remedies. *Morfologiya.* 2003;124(4):70-73.
21. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology.* 2010;8(6):1-5. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA - UNOESTE

16/04/2020

Certificado

### UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação  
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

### Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AO TRATO DIGESTÓRIO DO HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENÓXIACÉTICO (2,4-D)", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6032 e tendo como participante(s) VANESSA CAROLINA BARROS SILVA MARIOTTI (discente), ISABELLA ZAINA FERRARI NAUFAL (discente), ISADORA DE ALMEIDA RAMOS AMORIM (discente), JOSÉ LUIZ SANTOS PARIZI (docente), GISELE ALBORGHETTI NAI (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 11/03/2020.

#### MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
3761	17/05/2017	UNOESTE	NÃO	Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia - campus I

Presidente Prudente, 16 de Abril de 2020.

Prof. D. Luiz Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CPDI

Prof. Ms. Adriana Falco de Brito  
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

## ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA: DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES



<http://www.springer.com/journal/10620>

Digestive Diseases and Sciences

Editor-in-Chief: Kaunitz, J. - Managing Editor: Keeffe, M.

ISSN: 0163-2116 (print version)

ISSN: 1573-2568 (electronic version)

Journal no. 10620

### DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES

#### **Instructions for Authors**

Manuscripts submitted to *Digestive Diseases and Sciences (DDS)* should be concise, well organized, and clearly written. Acceptance of manuscripts will be based on originality and importance to the field of digestive diseases.

Submitted manuscripts are reviewed by the editor-in-chief and associate editors and, in the majority of cases, by two or more experts in the field. The editors can choose to reject a manuscript without peer review if the manuscript is of insufficient quality or relevance to warrant acceptance.

Manuscripts worthy of further consideration but deemed inappropriate for the journal's readership can be transferred to the Springer Transfer Desk at the recommendation of the handling editor with the consent of the authors. The Transfer Desk will then seek to find the best fit among the hundreds of biomedical journals published by Springer.

Manuscripts based on or describing the experimental or therapeutic use of complex mixtures of chemically undefined substances such as plant-derived extracts will be returned without further review.

Articles are checked for duplication. Articles with duplications considered excessive will not be published. If data from another publication is included, this should be clearly stated in the manuscript and referenced. In addition, how the submitted work differs from prior publications should be specifically stated.

The editors reserve the right to reject poorly written manuscripts regardless of scientific content. Submissions deemed of substantial scientific value but poorly written may be returned to the authors for editing by a professional service and/or a native English speaker. Springer reserves the right to copyedit accepted manuscripts. Proofs will be sent to the corresponding author for final approval and must be returned within 48 hours of receipt.

### CATEGORIES OF MANUSCRIPTS

The editors will consider and publish the following categories of manuscripts,

- **Original Article:** articles of interest to its readership that appeal to the practicing gastroenterologists and scientists working in academic institutions and in industry who focus on the study of the digestive organs including the gastrointestinal tract, pancreas, and hepatobiliary system. Three major categories are welcome:

1) Medical Education and Practice for articles focused on the delivery of medical care, disease classification, health outcomes, and other aspects of health services research, and on educational topics such as issues concerning gastrointestinal fellowship programs

2) Basic/translational, which encompasses experimental animal research and research on clinical subjects or material using non-standard analyses and testing fundamental mechanisms

3) Clinical articles, which can include meta-analyses, clinical trials of any design, biomarker studies, and any other clinically-based research of interest to our readership. Industry-sponsored articles will be considered provided that the relationship is clearly disclosed in the manuscript. An original article deemed of particular significance that is briefer than is usual may be reclassified as a brief report at the editor's discretion.

- **Review** (including systematic reviews and meta-analyses): Comprehensive and thoroughly referenced coverage of basic or clinical topics. Industry-sponsored reviews will be considered provided that the relationship to the sponsor is clearly disclosed in the manuscript.

- **Case Report**: in general, case reports are not encouraged; the editors will limit the number of case reports per issue and will only consider those reporting particularly novel and important clinical observations.

- **Correspondence**: concise opinions on papers published in DDS online within the past six months.

## SPECIAL SECTIONS

The editors welcome proposals for articles addressing topics of interest to the journal's readership in the following categories. Proposed articles must receive approval by section editors prior to submission. Please email a brief summary (250 words or less) specifying the category, proposed title, and a bulleted summary of the content to the editorial office at [dds.journal@gmail.com](mailto:dds.journal@gmail.com). Submitted full-length articles in these categories will be returned to the authors at the editor's discretion.

- **Mentored Reviews**: Reviews basic disease mechanisms or pathophysiology or of clinical topics. Mentored reviews must be coauthored by a trainee/postdoc/fellow and a faculty mentor.

- **Fellows and Young GIs Section**: a series of mini-reviews on the topics of education and training, with an emphasis toward trainees and young GIs, bringing to the forefront the evidence available for best practices, issues related to training programs, and other topics of interest to the most junior gastroenterologists.

- **Current Clinical Controversies**: Brief reviews addressing a controversial area of current interest to the GI community, providing incisive conclusions based on the best available evidence.

## SUBMISSION

Manuscripts should be submitted online using Springer's manuscript submission and review system, Editorial Manager, at <http://dds.edmgr.com>. Editorial Manager supports a wide range of submission file formats:

- Manuscripts: Word, WordPerfect, RTF, TXT, and LaTeX

- Figures: TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript (Color art is FREE for both online and print publication and is encouraged in the interest of visual appeal and clarity.)

(Please note that PDF is not an acceptable file format for manuscripts or figures.)



Manuscript submission requires the uploading of at least one manuscript file (including references), but a cover letter, figures, figure legends, and tables may also be uploaded as separate files. Files should ideally be posted in the following order (order can be changed after uploading):

1. Cover letter
2. Manuscript
3. Tables
4. Figure legends (if separate)
5. Figures
6. Other

For all article types except correspondence, submission also requires the suggestion of four to six peer reviewers (experts in the topic area of the manuscript and not recent collaborators or from the same institution as the author[s]), including name, department, institution, and email address.

Once the manuscript is uploaded to Editorial Manager, the corresponding author will receive an email requesting approval of the PDF created from the source files. If not done immediately following upload, it is important to review and approve the PDF to initiate review by the editors.

Should any difficulties arise while submitting manuscripts online, please contact the responsible editorial assistant by clicking “Contact Us” in the Editorial Manager toolbar at the top of each page. Once submitted, a manuscript’s progress through the review process may be tracked in real time.

#### **MANUSCRIPT STYLE -- ALL MANUSCRIPTS**

Titles should state the main findings of the article, not focus on design of the research, and should not exceed 120 characters (no spaces) in length. Do not use abbreviations in titles.

The title page should contain the title of the article, name(s) of author(s) and highest academic degree(s), department and institution from which the work originated, email and postal addresses of all authors, name of the corresponding author, acknowledgment of grant support, and disclosure of financial arrangements related to the research or assistance with manuscript preparation.

No more than one (1) corresponding author may be listed.

No more than one (1) first author may be listed.

See “Ethical Responsibilities of Authors” for information about author changes. *Digestive Diseases and Sciences* will only consider author additions BEFORE manuscript acceptance and only in special cases, e.g., when an author was added to conduct additional research in response to the comments of peer reviewers. All requests for author changes must be made by completing an authorship form (emailed by request), signed by all authors, which will be reviewed by the editor-in-chief and publishing editor.

Personal acknowledgments, if any, should be given in a separate section at the end of the article.

See “Disclosure of Potential Conflicts of Interest” below for details on including a conflict of interest and disclosure statement in the text of the manuscript.

Text should conform to accepted standards of American English style and usage. Before submitting an article to

DDS, authors for whom English is a second language are encouraged to have their manuscripts reviewed and professionally edited by an individual whose native

language is English. (Please see English Language Editing below.) All authors may also find the editor-in-chief's style guide, "DDS Elementary Style: A Brief Guide for Authors" helpful toward improving the readability and impact of their manuscript.

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10620-016-4223-1.pdf>

All manuscripts should be typed in 12-point font size and double-spaced with 1-inch margins. One space only should be used after periods and commas. Authors should retain a copy of all materials.

Keywords should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes and should preferably be terms from the Index Medicus Medical Subject Headings (MeSH) list. Figure title and caption material should appear in the legend and not on the figure. Legends should be typed double-spaced on pages separate from the text. Figures should be numbered in one consecutive series in the order in which they are cited in the text. Please include sufficient information in the legends to interpret the figures without reference to the text.

Illustrations should be clear, with sharp contrast, especially where fine lines such as those of grids or traces are to be retained. Illustrations should be no larger than 8½ × 11 inches, but preferably of a size not needing enlargement or reduction. Non-traceable (raster) line-art and photographs should ideally be provided as TIFFs of at least 600 dpi resolution. Please provide traceable (vector) figures in EPS format. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Scanned line drawings and line drawings in BMP format should have a minimum resolution of 1200 dpi. Halftone photographs should be provided as TIFFs of at least 200 dpi resolution.

Tables should be double-spaced on separate pages, with the table number and table title centered above the table and explanatory notes below the table.

No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. The grouping of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (e.g., using dividing lines) and in the text of the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to the whole image and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g., changes to gamma settings) are not permitted.

References should be cited in the text by Arabic numerals enclosed in square brackets. Only literature that is published or in press (with the name of the journal) may be numbered and listed. Abstracts and letters to the editor may also be cited, but should ideally be less than three years old and identified as such after the title, e.g., [Abstract] or [Letter to Editor].

The references section should be typed double-spaced on pages separate from the text and numbered consecutively in the order in which references are cited in text. Included are last names and initials of authors, title of article, name of publication, year published, volume, and inclusive pages. For references with more than six authors, the fourth and subsequent authors should be replaced with "et al."; for references with between one and six authors all the authors should be listed. Abbreviations should conform to those used in Index Medicus. References must be verified by the authors against original documents.

We recommend the use of tools such as EndNote\* or Reference Manager for reference management and formatting.

For authors using EndNote, the following output style supports DDS formatting of in-text citations and reference list:

<http://static.springer.com/sgw/documents/945137/application/zip/SpringerVancouverNumber.zip>

The style and punctuation of the references should conform to the following examples (text enclosed in [I] symbols below, should be italicized in the manuscript):

- *Article*

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, et al. Fecal bile acids, short-chain fatty acids, and bacteria after ileal pouch–anal anastomosis do not differ in patients with pouchitis. [I]Dig Dis Sci[I]. 1995;40:1471–1483.

- *Book*

Banks PA. [I]Pancreatitis[I]. New York, NY: Plenum Medical; 1979.

- *Contribution to a book:*

Creutzfeldt W. Endocrine tumors of the pancreas. In: Volk BW, Wellmann KF, eds. [I]The Diabetic Pancreas[I]. New York, NY: Plenum Medical; 1977:551–590.

- *Electronic:*

ISI Web of Knowledge. Journal Citation Reports, 2007 JCR Science Edition. Available at:

<http://isiwebofknowledge.com>. Accessed June 20, 2008.

## COPYRIGHT

Submission of a manuscript to *Digestive Diseases and Sciences* is a representation that the manuscript has not been published previously in any form, including symposia and proceedings of meeting, except in brief abstract form, and is not currently under consideration for publication elsewhere. Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice (<http://www.springeronline.com/openchoice/>), offprints, or printing of figures in color.

**Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.**

## MANUSCRIPT STYLE -- BY ARTICLE TYPE

**Original articles** should be arranged as follows: Title Page, Abstract, Keywords, Introduction, Methods, Results, Discussion, References, Tables, Figure Legends, and Figures. There is no maximum for word count, figures, tables, or references. Manuscripts should include a structured abstract of no more than 250 words organized as applicable into the following categories: Background, Aims, Methods, Results, and Conclusions. Abbreviations, footnotes, and references should not be used in the abstract, with the exception of standard, repetitive abbreviations such as HCV, GERD, etc. A list of four to six keywords should be provided directly below the abstract. Reports of prospective clinical trials with a control or comparison group should be presented according to the CONSORT guidelines (<http://www.consort-statement.org> or JAMA. 2001;285:1987-1991). The registry URL (e.g., <http://www.clinicaltrials.gov> in the United States) and clinical trial number should be included in the body of the manuscript in the methods section. Meta-analyses should conform to the PRISMA guidelines (see below).

**Review articles** should include a general abstract of no more than 250 words followed by four to six keywords. There is no maximum for word count, figures, tables, or references. All structured reviews and meta-analyses should adhere to the guidelines published by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and

Meta-Analyses (PRISMA) group (Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. PLoS Med. 2009 Jul 21;6); <http://www.prisma-statement.org>.

**Case reports** should not include an abstract and should not exceed 1,200 words, including title, author info, and no more than ten references. Case reports should include four to six keywords and ideally a short introduction and brief discussion, the latter highlighting key lessons from the case. (Case series can be submitted as article type Case Report or Original Article, depending in part on the number of cases being reported.)

**Correspondence** should be limited to 500 words and should relate to papers published in DDS online within the past six months.

Abbreviation

The correct abbreviation of *Digestive Diseases and Sciences* for abstracting and indexing purposes is: Dig. Dis. Sci. or Dig Dis Sci.

ISSN & EISSN

The international standard serial number (ISSN) for *Digestive Diseases and Sciences* is 0163-2116, and the

electronic international standard serial number (EISSN) is 1573-2568.

## ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.

Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a

10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

- English language tutorial
- Nature Research Editing Service
- American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

## ETHICS AND RESPONSIBILITY OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on

Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the

research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

**Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.
- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors and/or changing the order of authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the reason for the change(s) and the contribution role(s) of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief’s implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe

cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed.

### **COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS**

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

### **DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST**

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

□ Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work  
 In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

<https://www.springer.com/gp/authors-editors/journal-author/journal-author-helpdesk/publishing-ethics/14214>

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

## RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. This attestation should appear in the methods section of the manuscript. In countries where such mechanisms for approval do not exist, authors are required to indicate that the research was carried out in accordance with the Helsinki Declaration. A similar assurance is required to document that animal experimentation was performed under appropriate circumstances.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

## STATEMENT ON THE WELFARE OF ANIMALS

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national,

and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

### **INFORMED CONSENT**

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:|

**Informed consent:** “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

### **ETHICS AND DISCLOSURE POLICIES**

Material submitted to Digestive Diseases and Sciences (DDS) must be original and not published or submitted for publication elsewhere. Authors who have related material under consideration or in press elsewhere should upload a clearly marked copy at the time of their submission to DDS. If part of a contribution has appeared or



will appear elsewhere in press, the author must specify the details in the covering letter accompanying the DDS submission.

Duplicate publication (by the same author) and plagiarism (by a different author) must be avoided in accordance with “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” developed by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>). Each author must have participated substantially in the work and approve the final version of the manuscript. Where applicable, the following must be disclosed: all financial arrangements (research support, stock ownerships, equity interest, consultancies, or major honoraria) with a company whose product figures prominently in the manuscript; a statement of specific funding support; and identification of third party individuals who provided writing assistance. Reports of clinical trials with a control or comparison group should be presented according to the CONSORT guidelines (<http://www.consort-statement.org> or JAMA. 2001;285:1987-1991). The clinical trial registry URL (e.g., <http://www.clinicaltrials.gov> in the United States) and clinical trial number should be included in the body of the manuscript in the methods section.