



**PRÓ-REITORIA E PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

THAINÁ CAVALLERI SOUSA

**LONGA EXPOSIÇÃO A UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS
PREDISPÕE A PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS À LESÕES PRÉ-
NEOPLÁSICAS**

Presidente Prudente - SP
2022



**PRÓ-REITORIA E PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

THAINÁ CAVALLERI SOUSA

**LONGA EXPOSIÇÃO A UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS
PREDISPÕE A PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS À LESÕES PRÉ-
NEOPLÁSICAS**

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 Ciência Animal – área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

Presidente Prudente - SP
2022

636.089
H663e

Sousa, Thainá Cavalleri.

Longa exposição a uma mistura de desreguladores endócrinos predispõe a próstata ventral de ratos à lesões pré-neoplásicas / Thainá Cavalleri Sousa. – Presidente Prudente, 2023.
66 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Leonardo de Oliveira Mendes

1. Neoplasia intraepitelial prostática. 2. Disruptores endócrinos. 3. Exposição ambiental. I. Título.

THAINÁ CAVALLERI SOUSA

**LONGA EXPOSIÇÃO A UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS
PREDISPÕE A PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS À LESÕES PRÉ-
NEOPLÁSICAS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal – área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 27 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADOR

Orientador: Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Anthony César de Sousa Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr.^a Giovana Rampazzo Teixeira
Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família e aos meus avós, por sempre acreditarem no meu potencial, me apoiarem e se permitirem aprender comigo da mesma forma que aprendo com eles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Angela e Ronaldo, por serem a base de quem eu sou hoje como pessoa e cidadã, sendo a chave principal para todo o meu processo de educação. Sem eles, eu não seria capaz de prosseguir com a minha paixão pelo ensino.

Ao meu avô Osmar, por me mostrar o que é ciência e o quanto esta é importante para a sociedade. Com apenas o ensino básico, ele conseguiu alcançar conhecimento por conta própria, indo atrás de seus sonhos e me inspirando até hoje a nunca desistir.

Ao meu orientador e professor Leonardo, que me acompanha nesse caminho desde a iniciação científica e sempre acreditou no meu potencial. Agradeço pela paciência em todo o processo de elaboração do trabalho e também pela imensa oportunidade de continuar nesta área ao seu lado.

À minha irmã Thalita, que sempre foi meu porto seguro e a peça chave nos momentos onde mais precisei de apoio frente as dificuldades que surgiram durante os dois anos do curso de mestrado, por todo o seu carinho, cuidado e amor.

À toda a equipe do Laboratório de Patologia da UNOESTE, e em especial à professora Dr^a Gisele Nai, que nos cedeu o acesso ao laboratório para a realização de montagem e coloração de lâminas.

Ao Bruno Carrino, pela paciência, auxílio e disponibilidade quanto à fotografia de lâminas para a realização das análises.

À Médica Veterinária Gracielle por todo o acompanhamento durante a fase experimental do projeto, por todos os ensinamentos e pela paciência e disponibilidade nesse período.

À Dr^a Giovana Rampazzo, pela disponibilidade e auxílio nas análises laboratoriais e, em especial, à Maria Eduarda Tavares e Allice Santos pela paciência e generosidade de sempre durante as análises realizadas.

Aos meus amigos de graduação Amanda, Ítalo e Victor por todo o apoio durante o processo de seleção do mestrado e durante todo o período do curso. Desde a graduação, os levo como inspiração dentro da biologia.

Às minhas amigas (também conhecidas como minha segunda casa: Sofia, Tábata, Talita, Luana, Irene, Isabella, Ana, Ariela, Stephane, Laura, Beatriz, Bruna, Eduarda, Giovanna, Milla e Josy por aparecerem no momento em que mais precisei e me acolherem da melhor forma possível, estando perto ou longe. Através do apoio delas, pude lidar melhor com diversas situações e me aceitar da melhor forma durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus colegas de pesquisa Maria Luiza, Karianne, Andreia, Letícia e Ana Beatriz por toda a dedicação durante a execução e elaboração do trabalho. Sem o empenho de todas, nada teria sido possível. Agradeço também aos colegas Karol, Alan e Gabriel, que me ajudaram muito no decorrer do curso.

A todos os professores no curso de mestrado em Ciência Animal e Ciências da Saúde, por todos os ensinamentos e bases essenciais para aprimorar ainda mais a minha profissionalidade dentro do ramo da pesquisa e educação. Em especial, ao coordenador Anthony César e a vice-coordenadora Cecília por todo o apoio e disponibilidade.

Ao Dr. Wellerson Rodrigo Scarano e a doutoranda Ariana Musa, pela parceria e por sempre se mostrarem disponíveis quando necessitei de auxílio durante a elaboração da dissertação e do próprio projeto.

Aos meus melhores amigos Gustavo Lisboa, João Pedro, Gustavo Takazone, Henrique, Lucas, Milena e Andressa por estarem sempre presentes, e também por toda paciência e compreensão durante esses dois anos.

Por fim, aos grupos Bangtan Sonyeondan, Seventeen, Stray Kids, Astro e The Boyz por serem uma zona de conforto, acolhimento e de autoconhecimento para mim durante todo o período em que estive executando essa pesquisa. Diante do contexto pandêmico, todos sofremos impasses e muitos se viram impedidos de continuar a seguir os planos que vinham elaborando. Para mim, inclusive, foi um momento extremamente delicado, mas através da música eu busquei me reerguer e me conhecer novamente como pessoa. Sem isso, eu não seria quem eu sou hoje.

“Nem sempre se trata de fazer algo bom para sempre receber algo de volta, mas fazer pelo menos uma boa ação para alguém ou para o mundo, pelo menos uma vez por dia, essas pequenas boas ações definitivamente farão valer a pena.”

(Felix Lee)

RESUMO

Longa exposição a uma mistura de desreguladores endócrinos predispõe a próstata ventral de ratos à lesões pré-neoplásicas

Desreguladores endócrinos (DE) são compostos que modificam a biossíntese hormonal, causando consequências para a saúde humana, incluindo doenças crônicas, como o câncer. A próstata, um órgão hormônio-dependente, sofre influência dos DE tanto nos processos de diferenciação como no controle da homeostasia na fase adulta. Estudos têm focado apenas na avaliação dos efeitos de DE isolados ou em pequenos grupos e em curtos intervalos de tempo, não retratando adequadamente a exposição humana. Diante disso, a proposta do presente estudo é caracterizar os efeitos da exposição à uma mistura de DE baseada na exposição humana a partir da vida intra-uterina até a fase adulta sobre a morfologia prostática e seus aspectos histopatológicos. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: Grupo Ctrl (veículo: óleo de milho, por gavagem) e Grupo ED Mix: receberam 32,11mg/kg/dia da mistura constituída de doze compostos (ftalatos, pesticidas, filtros u.v., bisfenol A, butilparabeno) diluídos em óleo de milho (2ml/kg), por gavagem. As ratas prenhes ou lactentes receberam o tratamento do dia gestacional 7 (DG7) até o dia pós-natal 21 (DPN21). Após o desmame, no DPN22, os filhotes machos da geração F1 continuaram a receber a mistura completa de DE até os 220 dias de idade, quando foram eutanasiados. A próstata ventral foi coletada, dissecada e processada para análise histológica. Secções coradas com hematoxilina-eosina, picrossírius e azul de toluidina foram submetidas à análise fractal, análises estereológica, morfométrica, kariométrica, quantificação do volume relativo e dos tipos de colágeno e contagem de mastócitos. A mistura de DE provocou diminuição do compartimento epitelial, aumento da dimensão fractal e diminuição na dilatação glandular. Além disso, foi observada uma diminuição total do colágeno, caracterizado tanto pelo colágeno tipo I quanto tipo III. Ambos os grupos apresentaram focos inflamatórios estromais, porém sem diferença estatística, o que refletiu na quantidade semelhante de mastócitos. Houve presença de lesões proliferativas, neoplasia intraepitelial prostática, presença de adenocarcinoma invasor e regiões de atrofia epitelial no grupo exposto à mistura DE. Conclui-se que a mistura de DE foi capaz de causar alterações na histoarquitetura prostática e induzir o aparecimento de lesões pré-neoplásicas.

Palavras-chave: disruptores endócrinos; glândula prostática; exposição ambiental; neoplasia intraepitelial prostática.

ABSTRACT

Long exposure to a mixture of endocrine disruptors predisposes the ventral prostate of rats to pleneoplastic lesions

Endocrine disruptors (EDs) are compounds that modify hormone biosynthesis, causing consequences for human health, including chronic diseases such as cancer. The prostate, a hormone-dependent organ, is influenced by EDs both in differentiation processes and in the control of homeostasis in adulthood. Studies have focused only on evaluating the effects of EDs in isolation or in small groups and over short time intervals, not adequately portraying human exposure. Given this, the purpose of the present study is to characterize the effects of exposure to a mixture of EDs based on human exposure from intrauterine life through adulthood on prostate morphology and its histopathological aspects. Pregnant Sprague-Dawley females were randomly assigned to 2 experimental groups: Ctrl Group (vehicle: corn oil, by gavage) and ED Mix Group: received 32.11mg/kg/day of the mixture consisting of twelve compounds (phthalates, pesticides, u.v. filters, bisphenol A, butylparaben) diluted in corn oil (2ml/kg), by gavage. Pregnant or nursing rats received the treatment from gestational day 7 (GD7) to postnatal day 21 (PND21). After weaning, at PND22, male pups of the F1 generation continued to receive the complete ED mixture until 220 days of age, when they were euthanized. The ventral prostate was collected, dissected and processed for histological analysis. Sections stained with hematoxylin-eosin, picrosirius, and toluidine blue were subjected to fractal analysis, stereological, morphometric, karyometric analyses, quantification of relative volume and collagen types, and mast cell counts. ED mixing caused a decrease in epithelial compartment, an increase in fractal dimension, and a decrease in glandular dilatation. In addition, a total decrease in collagen was observed, characterized by both type I and type III collagen. Both groups showed stromal inflammatory foci, but without statistical difference, which reflected in the similar amount of mast cells. There was presence of proliferative lesions, prostatic intraepithelial neoplasia, presence of invasive adenocarcinoma and regions of epithelial atrophy in the group exposed to the ED mixture. It is concluded that the ED mixture was able to cause changes in prostatic histoarchitecture and induce the appearance of preneoplastic lesions.

Keywords: endocrine disruptors; prostate gland; environmental exposure; prostatic intraepithelial neoplasia.

LISTA DE SIGLAS

AF	- Análise Fractal
BPA	- Bisfenol A
DBP	- Di-n-butil ftalato
DE	- Desregulador endócrino
DF	- Dimensão Fractal
DEHP	- Di-(2-etilexil) ftalato
DG	- Dia gestacional
DPN	- Dia pós-natal
HE	- Hematoxilina e eosina
4-MBC	- 4-metil-benzidileno cânfora
MEC	- Matriz Extracelular
OMC	- Metoxinamato de Octila
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PIN	- Neoplasia intraepitelial prostática
PV	- Próstata Ventral

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	13
	ANEXO A- PARECER DO COMITÊ ASSESOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) E COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA).....	41
	ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH.....	42

1 **1 ARTIGO CIENTÍFICO**

2

3 **LONGA EXPOSIÇÃO A UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS**
4 **PREDISPÕE A PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS À LESÕES PRÉ-**
5 **NEOPLÁSICAS.**

6

7 Thaina Cavalleri Sousa¹, Leticia Pereira de Souza², Maria Luiza Silva Ricardo¹, Andreia Yuri
8 Yoshigae¹, Karianne Delalibera Hinokuma¹, Ana Beatriz Ratto Gorzoni¹, Ariana Musa de
9 Aquino³, Wellerson Rodrigo Scarano³, Anthony César de Sousa Castillho¹, Maria Eduarda
10 Almeida Tavares⁴, Alice Santos Cruz Veras⁴, Giovana Rampazzo Teixeira⁴, Gisele
11 Alborghetti Nai^{1,5}, Leonardo de Oliveira Mendes^{1,5*}

12

13 **Short Title:** Desreguladores Endócrinos e Alterações Prostáticas

14

15 ¹Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste
16 Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

17 ²Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente
18 Prudente, SP, Brasil.

19 ³Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências, IBB/UNESP,
20 Botucatu, SP, Brasil.

21 ⁴Laboratório Experimental de Biologia do Exercício (LEBioEx), FCT/UNESP, Presidente
22 Prudente, SP, Brasil.

23 ⁵Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente
24 Prudente, SP, Brasil.

25

26

27 *Corresponding author

28 Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

29 Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro

30 CEP 19067-175 - Presidente Prudente – SP-Brasil

31 e-mail: leobio85@gmail.com

32

33 O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico ao qual
34 será submetido: Environmental Science and Pollution Research, Fator de impacto: 5.190,
35 Qualis: A2.

36

37

38 *Authors Contributions*

39

40 *“All authors contributed to the study conception and design. Material preparations, data*
41 *collection and analysis were performed by Thainá Cavalleri Sousa, Leticia Pereira de Souza,*
42 *Maria Luiza Silva Ricardo, Andreia Yuri Yoshigae, Karianne Delalibera Hinokuma, Ana*
43 *Beatriz Ratto Gorzoni and Leonardo de Oliveira Mendes. The data analysis were performed*
44 *by Thainá Cavalleri Sousa, Ariana Musa de Aquino, Wellerson Rodrigo Scarano, Anthony*
45 *César de Sousa Castilho, Maria Eduarda Almeida Tavares, Alice Santos Cruz Veras,*
46 *Giovanna Rampazzo Teixeira, Giselle Alborghetti Nai and Leonardo de Oliveira Mendes and*
47 *all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved*
48 *the final manuscript.”*

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

RESUMO

LONGA EXPOSIÇÃO A UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS PREDISPÕE A PRÓSTATA VENTRAL DE RATOS À LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS.

Desreguladores endócrinos (DE) são compostos dispersos no meio ambiente, que modificam a biossíntese hormonal, causando consequências em órgãos hormônio-dependentes, como a próstata. Estudos têm focado apenas na avaliação dos efeitos de DE isolados ou em pequenos grupos e em curtos intervalos de tempo, não retratando adequadamente a exposição humana. Diante disso, nós caracterizamos a histoarquitetura prostática de ratos expostos desde a vida intrauterina até a fase à uma mistura de DE (DE Mix) baseada na exposição humana. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: Grupo Ctrl (veículo: óleo de milho, por gavagem) e Grupo ED Mix: receberam 32,11mg/kg/dia da mistura de DE diluídos em óleo de milho (2ml/kg), por gavagem, do dia gestacional 7 (DG7) até o dia pós-natal 21 (DPN21). Após o desmame, no DPN22, os filhotes machos continuaram a receber a mistura completa de DE até os 220 dias de idade, quando foram eutanasiados. A DE Mix provocou diminuição do compartimento epitelial, aumento da dimensão fractal e diminuição da dilatação glandular. Além disso, houve presença de neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau, além de regiões de atrofia epitelial no grupo exposto a DE Mix. No estroma, a exposição à mistura causou diminuição tanto do colágeno tipo I quanto tipo III. Conclui-se que a DE Mix foi capaz de causar alterações na histoarquitetura prostática e induzir o aparecimento de lesões pré-neoplásicas.

Palavras-chave: disruptores endócrinos, glândula prostática, exposição ambiental, neoplasia intraepitelial prostática

119 1 INTRODUÇÃO

120

121 Diversos desreguladores endócrinos (DE) estão ganhando atenção por sua ação no
122 sistema endócrino e, sobretudo, nos órgãos reprodutivos. Conforme a definição da OMS/IPCS
123 2002, “um DE é uma substância ou mistura exógena que altera as funções do sistema
124 endócrino e, conseqüentemente, causa efeitos adversos em um organismo intacto ou em sua
125 progênie” (Cargnelutti et al. 2021). Sendo assim, tais compostos são capazes de afetar a
126 síntese, secreção, transporte, metabolismo e diversas ações relacionadas a ligação ou
127 eliminação de hormônios endógenos responsáveis pela homeostase tecidual e celular
128 (Stukenborg et al. 2021). Em geral, os DE são um grupo heterogêneo de substâncias como
129 plastificantes, dioxinas, agentes farmacêuticos, fungicidas, pesticidas e outros produtos de
130 cuidados pessoais (Brehm, Flaws 2019), podendo ser expostos diariamente em nosso
131 cotidiano através da inalação, ingestão ou contato dérmico.

132 A frequente exposição causada pelos DE está relacionada com o surgimento de
133 lesões em órgãos do sistema reprodutor feminino e masculino, sendo mais recorrentes nos
134 testículos, próstata, ovários e mamas (Kahn et al. 2020). A próstata é uma glândula sexual
135 acessória do trato reprodutivo masculino circundante a porção proximal da uretra e
136 dependente de andrógenos e estrógenos (Motrich et al. 2018), sendo o câncer de próstata o
137 segundo mais frequente no mundo e o quinto com maior índice de mortalidade, somando uma
138 estimativa de quase 1.4 milhões de novos casos e 375.000 mortes em 2020 (Sung et al. 2021).

139 Sabe-se que os DE contêm ações estrogênicas e/ou antiandrogênicas, podendo afetar
140 os órgãos hormônio-dependentes, principalmente no período de programação do
141 desenvolvimento reprodutivo masculino, também conhecido como janela de programação de
142 masculinização (Welsh et al. 2008). Estudos demonstram que a próstata possui uma ampla
143 janela de susceptibilidade, como os de Wang et al. (2017) e Xia et al. (2018), que verificaram
144 que a exposição in útero e durante a lactação ao DEHP, um ftalato encontrado em diversos
145 produtos plastificantes, causou desbalanço hormonal e aumentou a susceptibilidade à
146 carcinogênese prostática na vida adulta.

147 Recentes estudos têm focado nos estudos de compostos isolados ou em pequenos
148 grupos, como relatado por Scarano et al. (2019), que analisaram uma mistura de 6 ftalatos
149 encontrados na urina de mulheres grávidas. Ao administrarem tal mistura durante o período
150 perinatal observaram alteração na expressão de 120 genes relacionados ao desenvolvimento,
151 diferenciação e oncogênese na próstata de ratos adultos. Para mimetizar uma exposição
152 ambiental mais realística, Christiansen et al. (2012) estabeleceram uma mistura de 13

153 compostos químicos que foram selecionados como representativos de vários outros DE com o
154 intuito de representar a exposição humana. A composição da mistura constituiu-se de 8
155 compostos caracterizados por possuírem, predominantemente, propriedades anti-
156 androgênicas: 2 ftalatos: di-n-butil ftalato (DBP) e di-(2-etilexil) ftalato (DEHP); 5 pesticidas:
157 vinclozin, procloraz, procimidona, linuron, epoxiconazol; o metabólito do pesticida DDT,
158 diclorodifenil-dicloroetileno (p,p'-DDE). Além disso, a mistura também contém quatro
159 substâncias predominantemente estrogênicas: dois filtros u.v., o metoxinamato de octila
160 (OMC) e o 4-metil-benzidileno cânfora (4-MBC); o composto fenólico bisfenol A (BPA); o
161 preservativo antifúngico butilparabeno. Por fim, a mistura também inclui a droga
162 paracetamol, previamente descrita como uma droga anti-androgênica (Kristensen et al 2012).

163 Outro fator pouco investigado dentro do âmbito dos DE é o tempo de exposição,
164 onde os períodos avaliados normalmente são bem definidos e não abrangem um amplo
165 período, dando ênfase em momentos específicos da morfogênese prostática ou da vida adulta.
166 Como exemplo, destacam-se os estudos de Brandt et al. (2014), que observaram que a
167 exposição intrauterina ao BPA foi responsável pelo estabelecimento de lesões prostáticas em
168 ratos adultos. Diferentemente, Huang et al. (2018) verificaram agravamento do quadro de
169 hiperplasia prostática benigna em ratos idosos expostos ao BPA dos 18 aos 21 meses de
170 idade, além do aumento da expressão de genes relacionados ao processo de transição epitélío-
171 mesenquimal.

172 Desta forma, torna-se evidente a importância de trabalhos que reúnam o maior
173 número de variáveis envolvidas no processo de exposição aos DE, como a combinação de
174 diferentes drogas em longos períodos, elaborando delineamentos experimentais que
175 mimetizem a exposição humana de maneira mais fidedigna. Diante disso, o presente estudo
176 teve como objetivo investigar os parâmetros histopatológicos do microambiente prostático de
177 ratos expostos a uma mistura de doze DE durante a gestação, lactação até a vida adulta.

178

179 **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

180

181 **2.1 Animais e Ambiente de Experimentação**

182 24 fêmeas adultas com 120 dias de idade, pesando aproximadamente 300g, e 12
183 machos adultos com 90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g da linhagem Sprague-
184 Dawley, foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de
185 Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), e mantidos no Biotério de
186 Experimentação Animal da UNOESTE, em condições controladas de luminosidade (12 horas

187 de luz/12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C a 25°C). Todos os animais
188 receberam ração comercial livre de fitoestrógenos (NUVILABCR1/NuvitalPR) e água filtrada
189 em bebedouros de vidro com tampa e bico metálicos com capacidade para 500 mL. Água e
190 ração foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram distribuídos na proporção de duas a três
191 fêmeas e um macho adulto para acasalamento por gaiola de polipropileno de 41x34x16cm,
192 com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho
193 autoclavada, sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas 2 vezes por semana.
194 Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições de umidade relativa do
195 ar (55 ± 10) e exaustão do ar contínua. Os procedimentos de manuseio, administração de
196 drogas, anestesia e eutanásia dos animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de
197 Animais da UNOESTE (Protocolo CEUA 6034). O estudo seguiu as recomendações do
198 *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments – ARRIVE* (Kilkenny et al. 2010).

199

200 **2.2 Mistura de DE**

201 Os compostos DBP (Cas nº 175606-05-0), DEHP (Cas nº 117-81-7), Vinclozin (Cas nº
202 50-471-44-8), Procloraz (Cas nº 67747-09-5), Procimidona (Cas nº 32809- 16- 8), Linuron
203 (Cas nº 330-55-2), Epoxiconazol (Cas nº 133855-98-8), p,p'-DDE (Cas nº 72- 55-9), 4-MBC
204 (Cas nº 36861-47-9), OMC (Cas nº 5466-77-3), BPA (Cas nº 80-05- 07) e Butilparabeno (Cas
205 nº 94-26-8) foram adquiridos junto à Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, EUA). A mistura de
206 DE, na concentração de 32,11 mg/kg/dia, foi diluída em óleo de milho (2 ml/kg) e
207 administrada por via oral (gavagem) nos animais durante o período gestacional, lactacional e
208 vida adulta.

209

210 **2.3 Delineamento Experimental**

211 Acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo. O dia zero de
212 prenhez/gestacional (DG0) foi determinado pela presença de esperma no esfregaço vaginal e a
213 citologia vaginal positiva da fase de estro. As fêmeas identificadas como prenhes foram
214 mantidas individualmente nas gaiolas e divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais
215 (n=10/grupo): Grupo Tratado (ED Mix): 32,11 mg/kg/dia da mistura de DE diluídos em óleo
216 de milho (2 ml/kg); Grupo Controle (Ctrl): (veículo: óleo de milho, por gavagem) por
217 gavagem. Os animais do grupo ED Mix receberam uma mistura de DE desenvolvida por
218 Christiansen et al. (2012) e reproduzida por Axelstad et al. (2014), Isling et al. (2014), Boberg
219 et al. (2015), Mandrup et al. (2015) e Johansson et al. (2016). Na mistura administrada aos
220 animais foi estabelecido um fator de correção de 100, que é comumente utilizado para

221 extrapolação de doses seguras (concentrações sem efeitos adversos observáveis – NOAEL: *no*
 222 *observed adverse effect levels*) determinadas em estudos com roedores para doses que podem ser
 223 consideradas seguras para humanos (ECHA, 2010). A composição da mistura é descrita
 224 detalhadamente na Tabela 1, adaptada de Christiansen et al. (2012).

225

226 Tabela 1. Composição da mistura, consumo humano individual ajustado dos compostos
 227 químicos e mistura administrada.

Compostos químicos	Consumo humano ajustado e escolhido como base para estudo das misturas (mg/kg de peso corpóreo ao dia)^a	Mistura administrada (mg/kg de peso corpóreo ao dia)
DBP	0,01	1
DEHP	0,02	2
Vinclozin	0,009	0,9
Procloraz	0,014	1,4
Procimidona	0,015	1,5
Linuron	0,0006	0,06
Epoxiconazol	0,01	1
p,p'-DDE	0,001	0,1
4-MBC	0,06	6
OMC	0,12	12
Bisfenol A	0,0015	0,15
Butilparabeno	0,06	6
Total (mg/kg)	0,32	32,11

228 ^a Baseado em Christiansen et al. (2012) para informações detalhadas sobre as estimativas do consumo humano e
 229 para as concentrações ajustadas que foram escolhidas como base para a mistura.

230

231 A mistura de DE apresentou uma adaptação em relação à mistura original (13
 232 compostos), com a retirada do paracetamol devido seu potencial hepatotóxico. Foi aplicado o
 233 tratamento nas ratas prenhes/lactentes do dia gestacional 7 (DG7) até o dia pós-natal 21
 234 (DPN21), nos mesmos períodos entre 8h à 10h. Estas foram mantidas em gaiolas individuais e
 235 pesadas em dias alternados para permitir o cálculo do volume da mistura de DE. Após o
 236 nascimento, o número de filhotes por ninhada foi ajustado para 8 (4 fêmeas e 4 machos) a fim
 237 de manter a proporção entre machos e fêmeas de 1:1, e ninhadas com número de filhotes

263 **2.4.1 Dados Biométricos**

264 A evolução do peso corporal foi realizada através da pesagem dos animais em dias
265 alternados nos períodos gestacional e lactacional (fêmeas) e pós-natal (machos) Após o
266 nascimento foi mensurada a distância anogenital da prole. No DPN 220, após eutanásia, a
267 próstata ventral, epidídimo e testículo direitos de todos os animais foram dissecados e pesados
268 em balança analítica (Owa Labor, Oschatz, Alemanha).

269

270 **2.4.2 Análise Histopatológica**

271 A análise histopatológica foi realizada de forma cega por observador experiente
272 usando um microscópio óptico padrão (NIKON Labohot, Japão). Os parâmetros avaliados na
273 próstata ventral foram: dilatação glandular (ausência ou presença); inflamação (ausência ou
274 presença); alterações neoplásicas (ausência, neoplasia intraepitelial prostática [PIN - baixo e
275 alto grau], adenocarcinoma in situ e adenocarcinoma invasor), necrose (ausência ou presença)
276 (Ayala, Ro 2007; Epstein 1995; Epstein, Herawi 2006).

277

278 **2.4.3 Análise Morfométrica**

279 Para a análise de altura epitelial foram capturadas secções histológicas de 10
280 animais/grupo, coradas com H.E, sendo capturadas (10 campos histológicos/secção, aumento
281 de 40x) e medidas 5 regiões distintas para cada imagem. A medida da altura do epitélio do
282 tecido prostático foi realizada em secções histológicas coradas com H.E seguindo as
283 instruções do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH),
284 disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

285

286 **2.4.4 Análise Estereológica**

287 A análise estereológica foi realizada em secções histológicas coradas com H.E de 10
288 animais/grupo, na qual foram capturados 10 campos histológicos/secção, em aumento de 40x,
289 e mensurada a proporção epitélio, lúmen e estroma através da Grade de Weibel. A Grade de
290 Weibel, contendo 168 pontos e 84 linhas, foi sobreposta à imagem histológica e, através do
291 software contador de células, foi estimada a proporção ocupada pelos compartimentos
292 (Weibel, Paumgartner 1978)

293

294 **2.4.5 Análise Kariométrica**

295 Para avaliar o fenótipo nuclear, a análise foi realizada em secções histológicas coradas
296 com H.E de 10 animais/grupo, sendo capturados 4 campos histológicos/secção, aumento de

297 100x e realizada a medição de 5 regiões nucleares/fotografia aleatórias. Áreas de seção
298 transversal nuclear (μm^2) e perímetros (μm) foram determinados para núcleos de 200 células
299 secretoras epiteliais células para obter o fator de forma $[=4\pi \cdot \text{área nuclear}/(\text{nuclear}$
300 $\text{perímetro})^2]$ parâmetro. O parâmetro do fator de forma mede arredondamento e valores <1
301 estão associados a núcleos menos redondos, como estabelecido por Taboga et al. (2003).

302

303 **2.4.6 Análise Fractal**

304 Foram analisadas secções histológicas, coradas com H.E, de 10 animais/grupo, sendo
305 fotografadas (10 campos histológicos/secção, aumento de 40x), binarizadas para leitura e a
306 dimensão fractal, utilizando como ferramenta o software Image J (Instituto Nacional de
307 Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet
308 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), pelo método box-counting. O software considerou o box-counting
309 em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço dessa
310 forma desconsiderando a textura da imagem. Com isso as duas imagens com a mesma
311 distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma
312 dimensão fractal. As análises foram guiadas na relação entre a resolução e a escala avaliada, e
313 o resultado fora quantitativamente expresso como a dimensão fractal do objeto que é $DF =$
314 $(\text{Log } N_r / \log r - 1)$, sendo N_r a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o
315 objeto original e r a escala aplicada ao objeto. Dessa forma, a dimensão fractal foi calculada
316 com o software Image J ficando sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes.

317

318 **2.4.7 Quantificação de Mastócitos**

319 Para a quantificação de mastócitos as lâminas foram coradas com azul de toluidina,
320 posteriormente analisadas em secções histológicas de 10 animais/grupo, sendo capturados 20
321 campos histológicos/secção, em aumento de 40x e realizada a contagem. Foram capturadas
322 imagens de forma aleatórias em 200 campos histológicos por grupo experimental, com cada
323 campo cobrindo uma área de $0,085 \text{ mm}^2$. O Azul de Toluidina permite a coloração
324 metacromática dos grânulos citoplasmáticos presentes nos mastócitos, devido à presença de
325 heparina e glicosaminoglicano. Dessa forma, sendo possível diferenciá-los em mastócitos
326 intactos e degranulados por meio da ausência ou presença de grânulos metacromáticos no
327 tecido conjuntivo circundante (Mendes et al., 2011)

328

329

330 **2.4.8 Quantificação do volume relativo de colágeno**

331 O volume relativo de colágeno foi quantificado nos cortes histológicos corados com
332 picrossírius usando o software Image J (National Institute of Health, EUA). Os cortes
333 histológicos de cinco animais de cada grupo foram analisados e as imagens foram capturadas
334 (10 campos histológicos/corte, aumento de 40x), totalizando 100 medidas por grupo. O
335 sistema foi programado para reconhecer apenas a cor vermelha e estimar a porcentagem de
336 colágeno (corado de vermelho) por campo histológico (Aquino et al., 2019).

337

338 **2.4.9 Quantificação dos Colágenos tipo I e tipo III**

339 As lâminas coradas com Picrossírius foram analisadas utilizando luz polarizada, que
340 diferencia os tipos de colágeno através da intensidade das fibras birrefringentes. Mais
341 especificamente, a coloração avermelhada representa o colágeno tipo I e a cor esverdeada
342 refere-se ao colágeno tipo III (Junqueira et al., 1978; Montes et al., 1980). Usando a
343 ferramenta RGB measure do Image J, as fibras de colágeno foram diferenciadas e
344 quantificadas. Este método mede separadamente os canais vermelho, verde e azul de uma
345 imagem RGB (Image J, 2004).

346

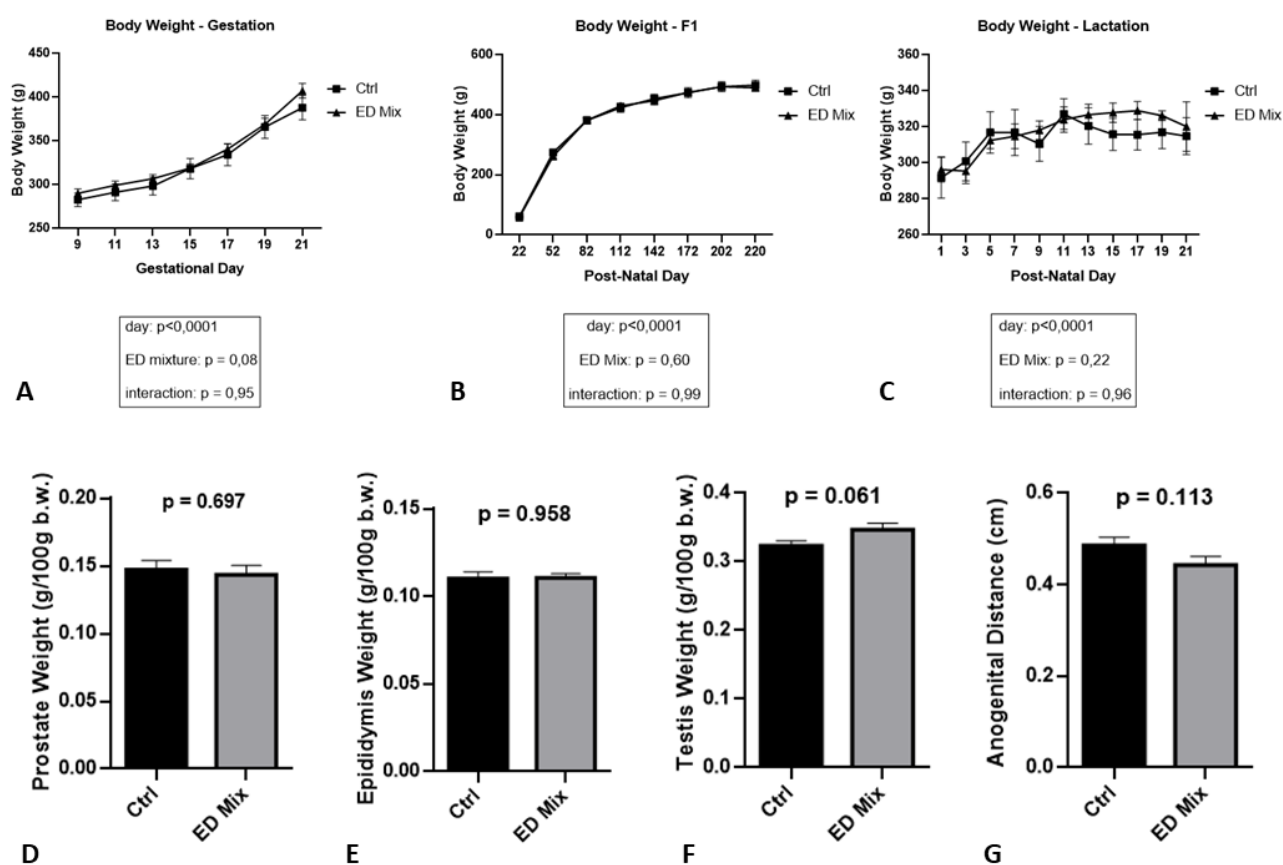
347 **2.5 Análise Estatística**

348 Os resultados obtidos nas análises foram testados estatisticamente pelo teste de
349 normalidade de Shapiro-Wilk, onde constatou-se que os dados biométricos (peso relativo do
350 testículo, epidídimo, próstata ventral e distância anogenital), análise fractal e quantificação de
351 mastócitos eram paramétricos. Posteriormente, foi aplicado o teste T-student para averiguação
352 da significância entre os grupos através do software Prism 5.0 (GraphPad) (significância com
353 valor de $p < 0,05$). Já as análises morfométrica, estereológica, kariométrica e quantificação do
354 colágeno não obtiveram distribuição normal, sendo aplicado o teste não paramétrico de Mann-
355 Whitney (significância com valor de $p < 0,05$). Para análise de evolução de peso corpóreo foi
356 realizado ANOVA (paramétrico) e Teste Binomial foi utilizado para a análise de incidência
357 de lesões (histopatológica).

358

359 **3 RESULTADOS**

360 Com relação aos dados biométricos, a mistura de DE não alterou o peso da próstata
361 ventral, do epidídimo e do testículo (Figura 2D, E, F) e não houve diferença na distância
362 anogenital (Figura 2G). Quanto ao peso corpóreo também não foram verificadas alterações ao
363 longo dos períodos avaliados (Figura 2A, B, C).



364

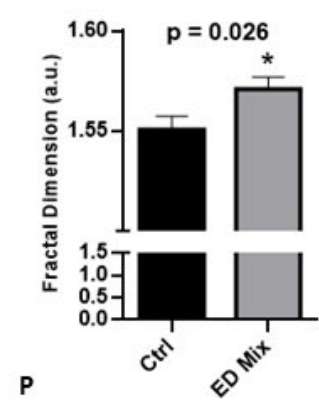
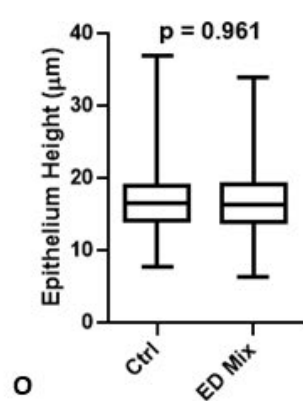
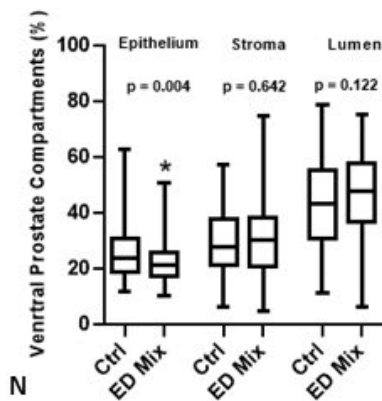
365 **Fig. 2** Evolução do peso corpóreo e dados biométricos dos ratos expostos durante a gestação,
 366 lactação e vida adulta a uma mistura de 12 DE baseada na exposição humana. Evolução do
 367 peso corpóreo na gestação (A), lactação (B) e vida adulta (C) analisados por ANOVA. Peso
 368 relativo da próstata (D), epidídimo direito (E), testículo direito (F) e distância anogenital (G)
 369 analisados por Teste t-student. Os resultados estão expressos em média \pm SEM

370

371 O compartimento prostático do grupo Ctrl apresentou-se composto por ácinos com
 372 epitélio cúbico simples e luz regular (Figura 3A, B), diferindo do grupo exposto à mistura de
 373 DE, que apresentou um epitélio altamente pregueado e luz tortuosa (Figura 3E). Este
 374 pregueamento do epitélio evidenciou áreas de hiperplasia focal (Figura 3F), caracterizada uma
 375 adaptação do microambiente prostático.

376 Além de regiões hiperplásicas, a próstata ventral (PV) do grupo ED Mix apresentou
 377 focos inflamatórios dispersos no estroma prostático (Figura 3G, seta). Em alguns locais, as
 378 células inflamatórias ultrapassavam a membrana basal do epitélio prostático, misturando com
 379 as células deste compartimento, ocasionando uma atipia reativa inflamatória, destacada na
 380 Figura 3H (seta). A imagem também destaca a presença de células inflamatórias no lúmen
 381 prostático (asterisco, Figura 3H) além de algumas regiões com inflamação extensa, alterando
 382 a estrutura tecidual típica do órgão (Figura 3I), caracterizando-se como regiões displásicas

383 (Figura 3K, seta). Além das lesões proliferativas, extensas regiões de atrofia epitelial também
 384 se mostraram presentes nos animais submetidos à mistura de DE (Figura 3L, M).



386

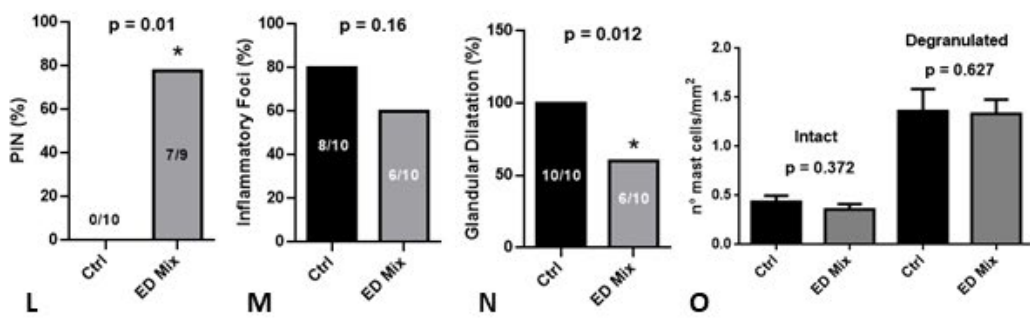
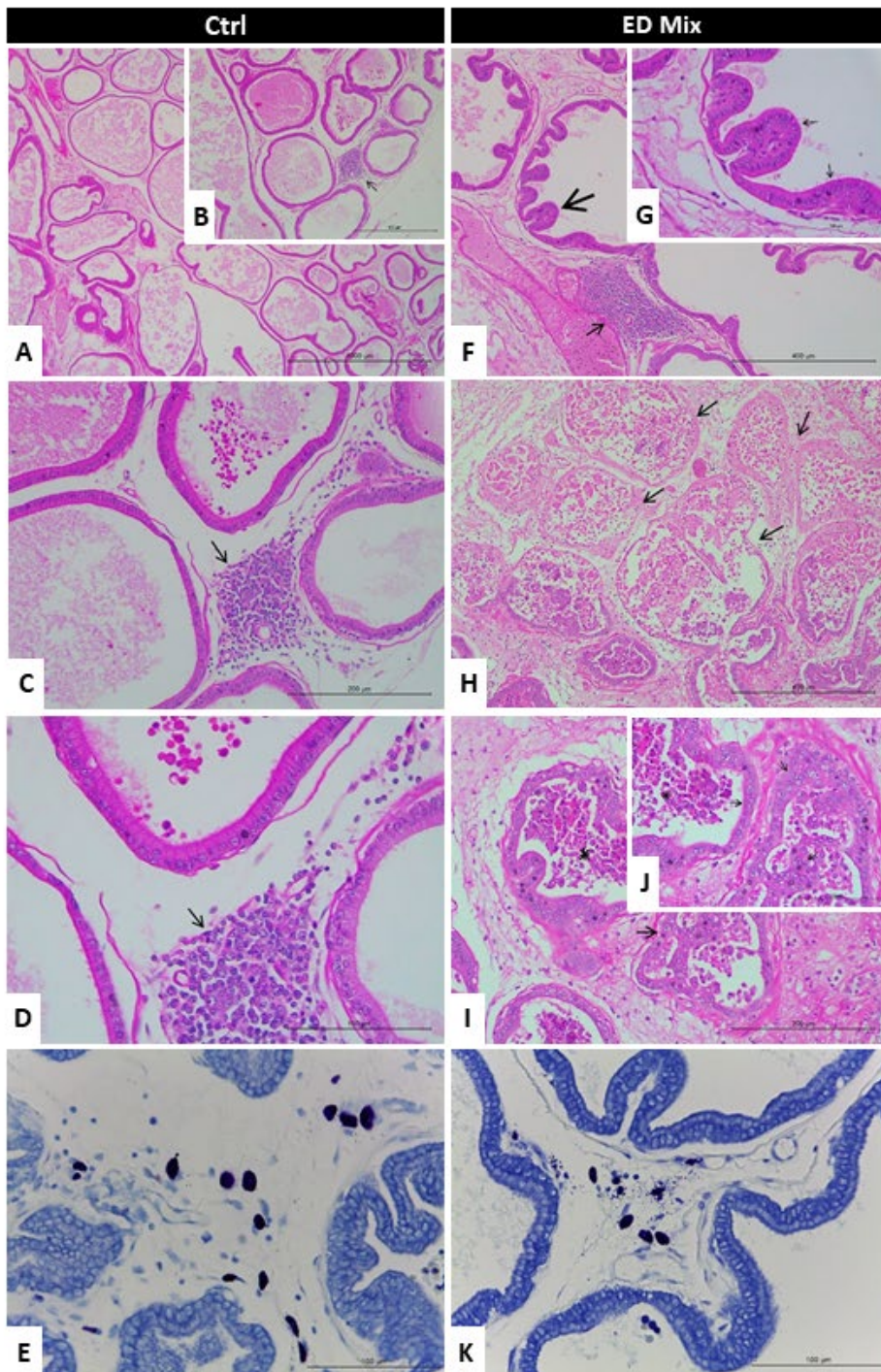
387

388 **Fig. 3** Secções histológicas da próstata ventral de ratos expostos durante a gestação, lactação e
389 até a fase adulta à uma mistura de doze DE. Coloração: HE. Aumento de 400x. Grupo Ctrl
390 (A, B, C, D), EP: epitélio; LU: lumen; ST: estroma. Grupo ED Mix: (E). (F) presença de FH:
391 hiperplasia focal. (G) setas indicando focos inflamatórios. (H) asterisco indicando – e IRA:
392 atipia reativa inflamatória. (I) elipse indicando IA: adenocarcinoma invasor. (J, K) seta
393 indicando Dys: displasia. (L, M) presença de EA: atrofia epitelial. (N) representação gráfica
394 da análise estereológica com n=10 animais/grupo, 10 campos histológicos/secção, revelando
395 dados não paramétricos (Teste Mann-Whitney, mediana; intervalo interquartil). (O)
396 representação gráfica da análise morfométrica com n=10 animais/grupo, 10 campos
397 histológicos/secção, revelando dados não paramétricos (Teste Mann-Whitney,
398 mediana; intervalo interquartil). (P) representação gráfica da análise fractal (10 animais/grupo,
399 10 campos histológicos/secção), (Teste T, expressos em média \pm SEM). * $p < 0.05$ em relação
400 ao grupo Ctrl.

401

402 O grupo ED Mix apresentou redução no espaço ocupado pelo compartimento
403 epitelial ($p = 0.004$, Figura 3N), porém sem diminuição da altura epitelial ($p = 0.961$, Figura
404 3O). A análise fractal também apontou diferença entre os grupos experimentais, mostrando
405 aumento da dimensão fractal no grupo exposto à mistura de DE e indicando um processo de
406 remodelação neste tecido ($p = 0.026$, Figura 3P).

407 A análise histopatológica revelou que 80% dos animais submetidos à mistura de DE
408 apresentaram áreas com neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGPIN) ($p = 0.01$,
409 Figura 4F, G e L) enquanto que este tipo de lesão não foi observado no grupo Ctrl (Figura 4A,
410 B). Somado a esta lesão proliferativa, a ED Mix induziu o aparecimento de ácinos menos
411 dilatados ($p = 0.012$, Figura 4B, N). Não foi observada diferença em relação à inflamação
412 estromal ($p = 0.16$, Figura 4M), além do número de mastócitos intactos ($p = 0.372$) e
413 degranulados ($p = 0.627$) que foi semelhante nos dois grupos experimentais (Figura 4O). Um
414 animal do grupo ED Mix apresentou adenocarcinoma invasor (Figura 4 H-J).



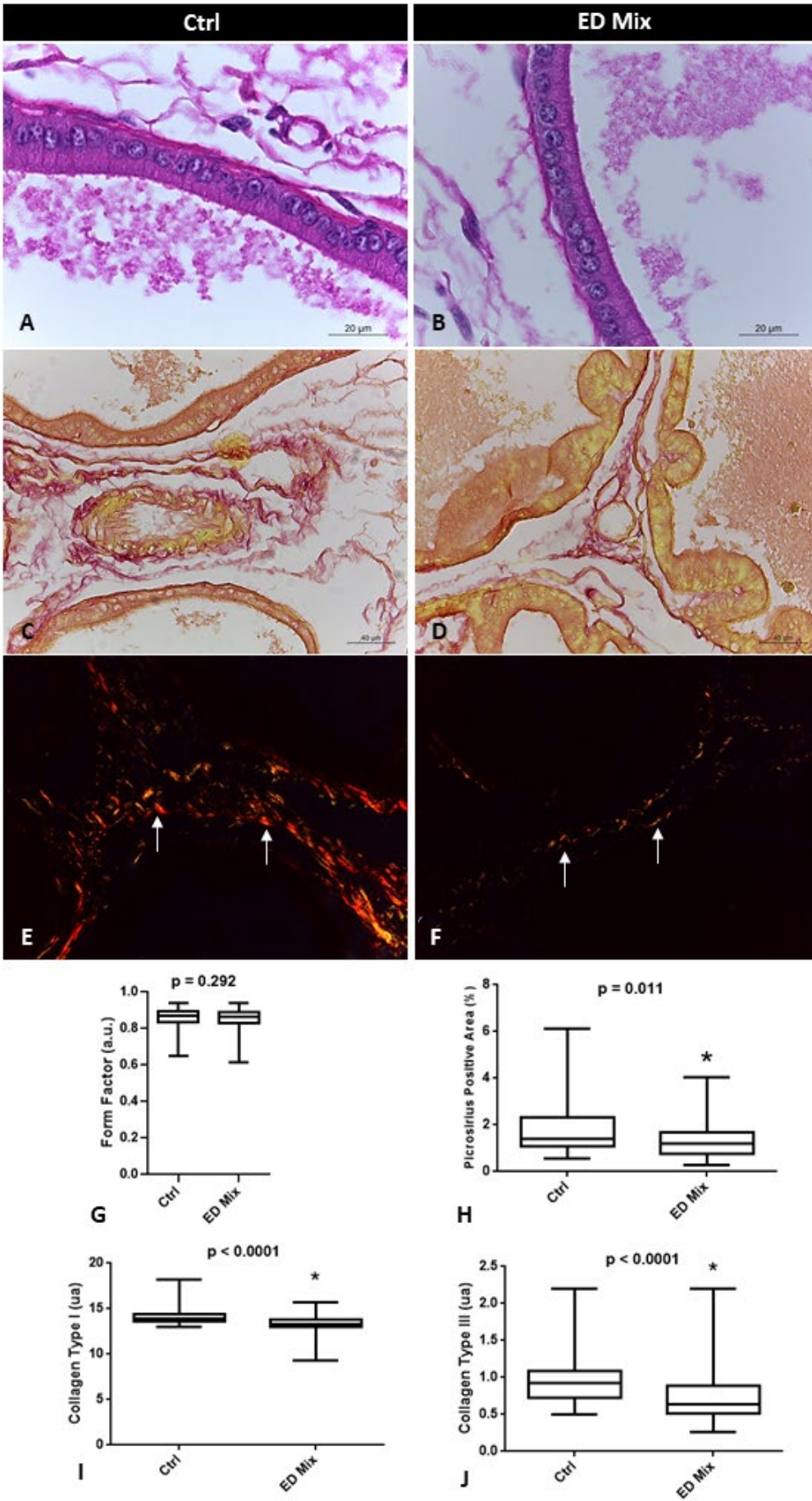
416 **Fig. 4** Secções histológicas da próstata ventral de ratos expostos durante a gestação, lactação e
417 até a fase adulta a uma mistura DE. Grupo Ctrl (A, B, C, D): Próstata com exuberante
418 dilatação glandular e estroma frouxo de permeio (A). Pequeno foco inflamatório entre as
419 glândulas (seta) (B), constituído por linfócitos (seta) (C). Células cuboidais com núcleos
420 basais e nucléolos diminutos (seta) (D). Grupo ED Mix com presença de PIN de baixo grau
421 (LGPIN) e inflamação (F, G): próstata com glândula com proliferação do epitélio (seta maior)
422 e foco inflamatório no estroma (seta menor) (F). Detalhe da glândula com epitélio proliferado
423 e perda de polarização dos núcleos e nucléolos evidentes (G, seta). Grupo ED Mix com
424 presença de adenocarcinoma invasor da próstata (H, I, J): detalhe das glândulas necróticas
425 onde não se observam núcleos no epitélio (H, setas), células epiteliais com arranjo cribriforme
426 (I, seta) e comedonecrose central (I, asterisco). Detalhe da imagem anterior mostrando a
427 comedonecrose no centro das glândulas (J, asterisco) e perda de polarização dos núcleos,
428 núcleos vesiculosos e grandes nucléolos (J, seta). Presença de mastócitos intactos e
429 degranulados no estroma prostático dos animais do grupo Ctrl (E) e Mix DE (K).
430 Representação gráfica da contagem de mastócitos (O). Aumento de 40X, 100X, 200X, 400X.
431 Colorações: HE, Azul de Toluidina. Teste Binominal (L, M, N) e Teste T (resultados
432 expressos em média \pm SEM) (O).

433

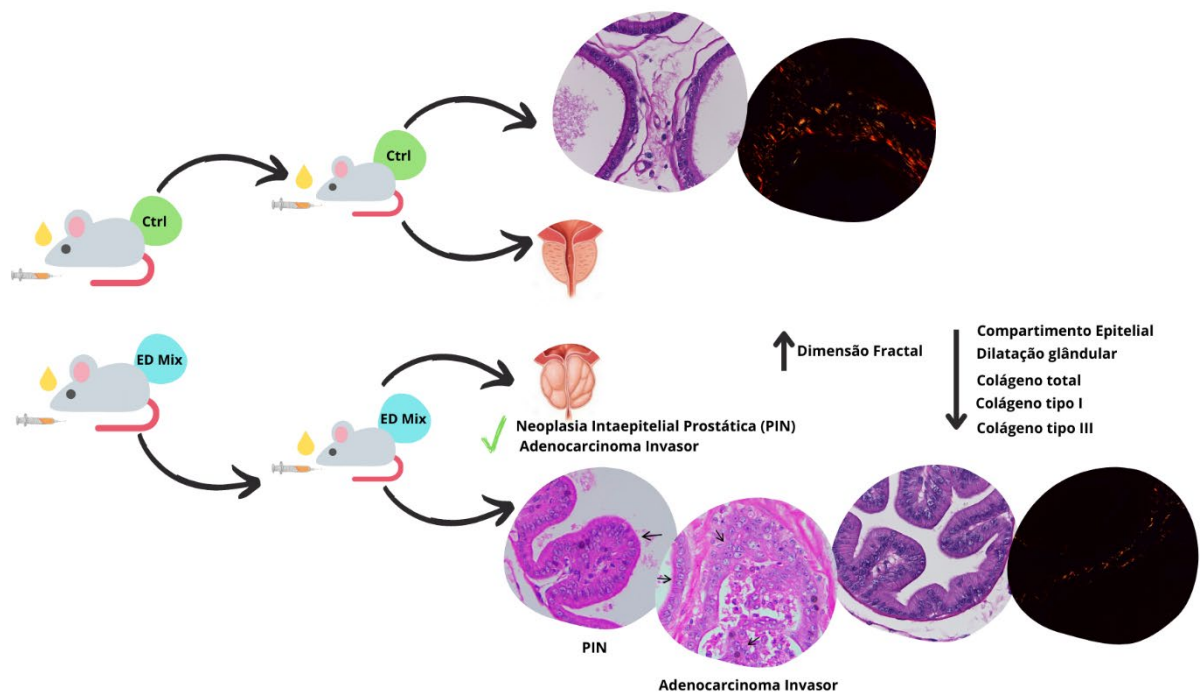
434 A exposição à mistura de DE não alterou os fenótipos nucleares das células epiteliais
435 ($p = 0.292$, Figura 5G). Com relação ao compartimento estromal, a mistura ocasionou uma
436 diminuição da área total de colágeno ($p = 0.011$, Figura 5H), assim como a diminuição dos
437 colágenos tipo I ($p < 0.0001$) e tipo III ($p < 0.0001$) (Figura 5I, J).

438

439



440 **Fig. 5** Secções histológicas da próstata ventral de ratos expostos durante a gestação, lactação e
 441 até a fase adulta a uma mistura de doze DE. Coloração: HE, Picrossírius. Ampliação: 400x (C
 442 - F), 1000x (A e B). Características morfológicas e a correspondente comparação entre os
 443 compartimentos prostáticos nos animais do grupo Ctrl (A e C) e ED Mix (B e D) (10
 444 animais/grupo). Imagens polarizadas dos respectivos grupos (E, F) indicando os tipos de
 445 colágeno (setas). Representação gráfica da análise kariométrica (G), área ocupada por
 446 colágeno (H) e a quantificação dos colágenos tipo I (I) e tipo III (J). Os resultados são
 447 expressos em mediana; intervalo interquartil. Teste de Mann-Whitney, *p < 0,05 em relação ao
 448 grupo Ctrl
 449
 450



451 **Fig. 6** Graphical abstract

452

453 4 DISCUSSÃO

454 O presente estudo, ao avaliar um protocolo que mimetiza a exposição humana à uma
 455 mistura de DE ao longo da vida, mostra que tais compostos são capazes de alterar a
 456 histoarquitetura do microambiente prostático, sendo responsáveis pelo surgimento de lesões
 457 pré-neoplásicas, indicando a influência do ambiente no processo de saúde/doença dos
 458 indivíduos.

459 Os resultados de evolução de peso corpóreo revelaram que a exposição não
 460 influenciou no peso materno e da prole, de maneira que os animais ganharam peso ao longo
 461 dos dias independente do grupo ao qual faziam parte. Hass et al. (2016) verificaram que a
 462 exposição durante a gestação ao BPA também não foi capaz de alterar o peso corpóreo dos
 463 filhotes machos desde o nascimento até o oitavo mês de vida, enquanto que as filhotes fêmeas

464 expostas a baixas doses tiveram aumento significativo de peso entre o nono e décimo terceiro
465 mês de idade. Em contrapartida, evidências demonstraram diminuição de peso corporal da
466 geração parental e da prole de ratos tratados com Vinclozolin em altas doses (100 mg/kg/peso
467 corpóreo), valor considerado acima do NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*, nível
468 sem efeitos adversos observáveis) (Schneider et al. 2011). Portanto, demonstra-se que as
469 variações dos parâmetros biométricos dependem do modo de ação do DE (anti-androgênico
470 ou estrogênico) e de altas doses.

471 Com relação aos órgãos, a mistura de desreguladores não ocasionou efeito sob o peso
472 do testículo, epidídimo, próstata ventral e na evolução do peso corporal. Prins et al. (2007)
473 mostraram que os efeitos proliferativos focais encontrados na próstata de animais expostos a
474 DE são improváveis de serem refletidos no peso deste órgão, levando em consideração a dose
475 ambientalmente relevante utilizada. Normalmente, em estudos toxicológicos, as alterações
476 nos pesos dos órgãos são dose-dependente, como observado em Christiansen et al. (2012). Os
477 autores, ao utilizarem uma mistura semelhante ao do presente estudo, não observaram
478 diferença no grupo exposto às baixas doses. Por outro lado, em altas doses, foi observada
479 diminuição do peso prostático, onde os autores relacionaram com a ação estrogênica de
480 alguns componentes da mistura. As alterações proliferativas evidenciadas em doses
481 ambientalmente relevantes não são suficientes para alterar o peso, mas são importantes para
482 obter um olhar preventivo quando relacionado à dose administrada.

483 Há divergências na literatura a respeito da influência dos DE sobre aspectos
484 histomorfométricos prostáticos. Estas discrepâncias são resultado dos diferentes períodos de
485 exposição e do uso de DE variados que, dependendo do potencial estrogênico ou anti-
486 androgênico que possuem, refletirá em respostas diversas no microambiente prostático. A
487 próstata está, em todos os períodos da vida, sob influência receptores hormonais, como o
488 receptor de andrógeno (AR), estrógeno alfa ($ER\alpha$) e estrógeno beta ($ER\beta$), sendo estes
489 susceptíveis à ação de DE. Tais compostos são capazes de alterar a função dos receptores
490 hormonais, o que refletirá em alterações histopatológicas (Lacouture et al. 2021).

491 Dentre as alterações teciduais ocasionadas pela mistura de DE, destaca-se a redução
492 do volume do compartimento epitelial acompanhada da diminuição da dilatação glandular.
493 Resultados semelhantes foram também relatados por Mendes et al (2015), após exposição de
494 ratos ao consumo crônico de etanol. Álcool também é considerado um DE, visto que altera a
495 homeostasia hormonal, diminuindo a concentração de testosterona (Sáttolo et al. 2004; Fávoro
496 et al. 2008). A redução do compartimento glandular reflete uma diminuição do volume celular

497 e tem, como consequência, diminuição da atividade sintética da célula, o que pode impactar
498 na homeostasia do órgão. (Sáttalo et al. 2004; Mendes et al. 2015).

499 Levando em consideração que o desenvolvimento prostático se inicia na vida fetal e
500 ocorre até a fase adulta, quando se dá a maturação do órgão, (Scarano et al. 2018), a
501 exposição aos DE neste período pode levar a alterações no padrão de desenvolvimento
502 glandular. As regiões de displasia e PIN encontradas no grupo tratado com a mistura também
503 foi relatada por Scarano et al. (2009) e Peixoto et al. (2016) durante a exposição perinatal ao
504 DBP, um tipo de ftalato presente em cosméticos e medicamentos. Isso demonstra a
505 plasticidade tecidual frente aos insultos ambientais, resultando em importantes respostas
506 adaptativas celulares e distúrbios proliferativos pré-neoplásicos. Outras investigações
507 correlacionam a exposição de substâncias estrogênicas com o surgimento de lesões
508 displásicas, bem como desorganização epitelial (Prins 1992; Pylkkänen et al. 1993). Tais
509 alterações foram encontradas, praticamente, em todos os animais expostos à mistura de DE do
510 nosso experimento, e representam um fator de predisposição para a carcinogênese prostática
511 (De Marzo et al., 2010).

512 A desorganização tecidual verificada na análise histopatológica foi confirmada pela
513 análise fractal, com aumento da dimensão fractal no grupo exposto a mistura. Apesar de
514 encontrarmos respostas conflitantes na literatura científica, visto que alguns autores
515 caracterizam o aumento da dimensão fractal de forma proporcional a agressividade de
516 tumores e a desorganização tecidual na próstata (De Arruda et al. 2013), há estudos que
517 indicam maior índice deste padrão em tecidos prostáticos não tumorais (Pu et al. 2012).
518 Contudo essa análise tem apresentado sucesso para avaliações morfológicas mais complexas e
519 irregulares (Tambasco et al. 2009; Waliszewski et al. 2015), mostrando-se eficiente em nosso
520 delineamento experimental e corroborando com as outras análises utilizadas, evidenciando as
521 alterações histomorfométricas glandulares constatadas.

522 Apesar da alta incidência de LGPIN, apenas um animal apresentou adenocarcinoma
523 invasor. O estabelecimento de lesões neoplásicas não foi uma característica do presente estudo,
524 o que corrobora com a ausência de alteração nos fenótipos nucleares. Gonçalves et al. (2017),
525 ao expor gerbilos à um protocolo de indução tumoral química, verificou diminuição do fator
526 forma obtido após a análise kariométrica, o que indica a presença de núcleos atípicos de
527 formato irregular. Padrão semelhante é observado no câncer de próstata humano, onde a
528 agressividade do tumor é proporcional ao surgimento de alterações nucleares (Colanzi et al.
529 1999; Montironi et al. 2002; 2005).

530 Desviando os olhares para o estroma prostático, a mistura de DE não aumentou os
531 focos inflamatórios nos animais, assim como a quantidade de mastócitos intactos e
532 degranulados. A próstata possui uma população de mastócitos pré-estabelecida, como um tipo
533 celular constituinte do tecido conjuntivo estromal e essencial ao sistema imune (Wasiuk et al.
534 2009). A inflamação neste órgão é um processo comum em homens durante o
535 envelhecimento, com aumento de 80 a 90% no grau de inflamação e do número de células
536 imunes prostáticas (como os macrófagos e os mastócitos) (Sfanos et al. 2017). Em casos
537 severos de hiperplasia prostática e prostatite, é observado aumento de células inflamatórias,
538 como descrito por Banklr et al (2001). Apesar dos mastócitos desempenharem papéis diversos
539 no microambiente tumoral, como a proliferação e sobrevivência celular, angiogênese,
540 invasividade e metástase (Aponte-López, Munhoz-Cruz 2020), nosso estudo não identificou o
541 estabelecimento de um ambiente hiperplásico generalizado ou tumoral para justificar o
542 aumento da população de mastócitos.

543 Com relação aos componentes não celulares do estroma prostático, as fibras de
544 colágeno têm um papel importante na homeostasia prostática e são as maiores proteínas
545 estruturais da matriz extracelular, sendo os colágenos tipo I e tipo III os principais
546 constituintes do compartimento estromal (Shoulders, Rainers 2009). O colágeno é importante
547 na constituição e integridade do tecido, onde a diminuição deste componente pode acarretar
548 em alterações na histoarquitetura do órgão. Sabe-se que essas fibras são também responsáveis
549 pela regulação da expressão gênica associada à sinalização celular, ao metabolismo e
550 transcrição de genes (Gonçalvez et al. 2015), agindo fundamentalmente no controle da
551 homeostase do microambiente estromal prostático e atuando também na remodelação da
552 matriz extracelular (Duarte et al. 2012).

553 Fávoro et al. (2012) mostraram que a diminuição das fibras de colágeno é observada
554 no estroma tumoral da próstata humana, trazendo a correlação entre as alterações dos
555 componentes do tecido conjuntivo colaborando com o aumento da agressividade tumoral. Já
556 Aquino et al. (2019) relacionam a diminuição do colágeno estromal na próstata de ratos
557 expostos ao arsenito de sódio com uma resposta reduzida aos andrógenos, podendo
558 influenciar na proliferação celular e na secreção de células epiteliais e estromais. Associando
559 aos dados já reportados, Seandel et al. (2001) demonstraram que a clivagem do colágeno tipo
560 I é um processo necessário para a angiogênese no ambiente tumoral, compactuando com os
561 estudos citados acima acerca da influência desse componente no ambiente prostático e seu
562 papel na remodelação tecidual frente a estímulos neoplásicos.

563 Este é o primeiro estudo na literatura científica a utilizar um delineamento
564 experimental que mimetiza a exposição humana, demonstrando que o ambiente possui um
565 papel relevante na homeostasia prostática. Assim, é de suma importância que mais pesquisas
566 associem fatores que tenham impacto no âmbito social, como doses ambientalmente
567 relevantes e longos períodos de exposição, sendo assim capazes de avaliar os reflexos na
568 saúde humana.

569

570 **5 CONCLUSÃO**

571 Assim, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a
572 mistura com DE foi capaz de alterar a morfologia da próstata ventral, induzindo o
573 aparecimento de lesões pré-neoplásicas.

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596 **6 REFERÊNCIAS**

597

598 Aquino AM, Salata GC, Pinho CF, De Freitas ATAG, Périco LL, De Lion Siervo GEM,
599 Mendes LO, Da Cunha De Medeiros P, Justulin LA, Fernandes GSA, Perobelli JE, Scarano
600 WR (2019) Arsenic exposure during prepuberty alters prostate maturation in pubescent rats.
601 *Reprod Toxicol* 89:136-144. doi: 10.1016/j.reprotox.2019.07.010

602

603 Aponte-López A, Muñoz-Cruz S (2020) Mast Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv*
604 *Exp Med Biol* 1273:159-173. doi: 10.1007/978-3-030-49270-0_9

605

606 Ayala AG, Ro JY (2007) Prostatic intraepithelial neoplasia: recent advances. *Arch Pathol Lab*
607 *Med* 131(8):1257-66. doi: 10.5858/2007-131-1257-PINRA

608

609 Axelstad M, Christiansen S, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, Isling LK, Kortenkamp A,
610 Hass U (2014) Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental
611 effects in preweaning rats. *Reproduction* 147(4):489-501. doi: 10.1530/REP-13-0447

612

613 Bankl HC, Samorapoompichit P, Pikula B, Latinovic L, Bankl H, Lechner K, Valent P (2001)
614 Characterization of human prostate mast cells and their increase in periprostatic vein
615 thrombosis. *Am J Clin Pathol* 116(1):97-106. doi: 10.1309/C0TP-MA3M-K5FX-3Q2F

616

617 Boberg J, Johansson HK, Hadrup N, Dreisig K, Berthelsen L, Almstrup K, Vinggaard AM,
618 Hass U (2015) Perinatal exposure to mixtures of anti-androgenic chemicals causes
619 proliferative lesions in rat prostate. *Prostate* 75(2):126-40. doi: 10.1002/pros.22897

620

621 Brandt JZ, Silveira LT, Grassi TF, Anselmo-Franci JA, Fávaro WJ, Felisbino SL, Barbisan
622 LF, Scarano WR (2014) Indole-3-carbinol attenuates the deleterious gestational effects of
623 bisphenol A exposure on the prostate gland of male F1 rats. *Reprod Toxicol* 43:56-66. doi:
624 10.1016/j.reprotox.2013.11.001

625

626 Brehm E, FLAWS JA (2019) Transgenerational effects of endocrine-disrupting chemicals on
627 Male and female reproduction. *Endocrinol* 160(6):1421–1435. doi: 10.1210/en.2019-00034

628

629 Cargnelutti F, Di Nisio A, Palotti F, Sabovic I, Spaziani M, Tarsitano MG, Paoli D, Foresta C
630 (2021) Effects of endocrine disruptors on fetal testis development, male puberty, and
631 transition age. *Endocrine* 72(2):358–374. doi: 10.1007/s12020-020-02436-9

632

633 Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, Faust M,
634 Lichtensteiger W, Schlumpf M, Burdorf A, Hass U (2012) Mixtures of endocrine disrupting
635 contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J*
636 *Androl* 35(3):303-16. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01242.x

637

638 Colanzi P, Santinelli A, Mazzucchelli R, Pomante R, Montironi R (1999) Changes in the
639 normal-looking epithelium in prostates with PIN or cancer. *Adv Clin Path* 3(4):129-34.
640 PMID: 10936890

641

642 De Arruda PF, Gatti M, Facio FN Jr, de Arruda JG, Moreira RD, Murta LO Jr, de Arruda LF,
643 de Godoy MF (2013) Quantification of fractal dimension and Shannon's entropy in

- 644 histological diagnosis of prostate cancer. *BMC Clin Pathol* 13:6. doi: 10.1186/1472-6890-13-
645 6
646
- 647 De Marzo AM, Nelson WG, Bieberich CJ, Yegnasubramanian S (2010) Prostate cancer: New
648 answers prompt new questions regarding cell of origin. *Nat Rev Urol* 7(12):650-2. doi:
649 10.1038/nrurol.2010.188
650
- 651 Duarte AH, Colli S, Alves-Pereira JL, Martins MP, Sampaio FJB, Ramos CF (2012) Collagen
652 I and III and metalloproteinase gene and protein expression in prostate cancer in relation to
653 Gleason score. *Int braz j urol* 38(3):341–355
654
- 655 ECHA 2010. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter
656 R.8: Characterization of dose [concentration]-response for human health.
657
- 658 Epstein JI (1995) Grading of prostate adenocarcinomas. In: Epstein JI. *Prostate biopsy*
659 *interpretation*. New York: Lippincott-Raven Publishers 65-85
660
- 661 Epstein JI, Herawi M (2007) Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial
662 neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: implications for patient care. *J Urol* 175(3
663 Pt 1):820-34
664
- 665 Fávvaro WJ, CAGNON VHA (2008) Immunolocalization of androgen and oestrogen receptors
666 in the ventral lobe of rat (*Rattus norvegicus*) prostate after long-term treatment with ethanol
667 and nicotine. *Int J Androl* 31(6): 609–618. doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00817.x
668
- 669 Fávvaro WJ, Hetzl AC, Reis LO, Ferreira U, Billis A, Cagnon VH (2012) Periacinar retraction
670 clefting in nonneoplastic and neoplastic prostatic glands: artifact or molecular involvement.
671 *Pathol Oncol Res* 18(2):285-92. doi: 10.1007/s12253-011-9440-5
672
- 673 Gonçalves BF, Campos SG, Costa CF, Scarano WR, Góes RM, Taboga SR (2015) Key
674 participants of the tumor microenvironment of the prostate: an approach of the structural
675 dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal
676 transition. *Acta Histochem* 117(1):4-13. doi: 10.1016/j.acthis.2014.10.009
677
- 678 Gonçalves BF, de Campos SGP, Góes RM, Scarano WR, Taboga SR, Vilamaior PSL (2017)
679 Dual action of high estradiol doses on MNU-induced prostate neoplasms in a rodent model
680 with high serum testosterone: Protective effect and emergence of unstable epithelial
681 microenvironment. *Prostate* 77(9):970-983. doi: 10.1002/pros.23353
682
- 683 Hass U, Scholze M, Christiansen S, Dalgaard M, Vinggaard AM, Axelstad M, Metzдорff SB,
684 Kortenkamp A (2007) Combined exposure to anti-androgens exacerbates disruption of sexual
685 differentiation in the rat. *Environ Health Perspect* 114:648-57. doi: 10.1289/ehp.9360
686
- 687 Huang DY, Zheng CC, Pan Q, Wu SS, Su X, Li L, Wu JH, Sun ZY (2018) Oral exposure of
688 low-dose bisphenol A promotes proliferation of dorsolateral prostate and induces epithelial-
689 mesenchymal transition in aged rats. *Sci Rep* 8(1):490. doi: 10.1038/s41598-017-18869-8
690
- 691 ImageJ. RGB Measure. RGB_Measure.java ed: Wayne Rasband; 2004
692

- 693 Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, Mandrup KR, Axelstad M, Christiansen S, Vinggaard AM,
694 Taxvig C, Kortenkamp A, Hass U (2014) Late-life effects on rat reproductive system after
695 developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters. *Reproduction* 147(4):465-76.
696 doi: 10.1530/REP-13-0448
- 697
- 698 Johansson HK, Jacobsen PR, Hass U, Svingen T, Vinggaard AM, Isling LK, Axelstad M,
699 Christiansen S, Boberg J (2016) Perinatal exposure to mixtures of endocrine disrupting
700 chemicals reduces female rat follicle reserves and accelerates reproductive aging. *Reprod*
701 *Toxicol* 61:186-94. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.03.045
- 702
- 703 Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R (1978) Differential staining of collagens type I, II
704 and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 41(3):267-74
705 doi:10.1679/aohc1950.41.267
- 706
- 707 Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L (2020) Endocrine-disrupting
708 chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8(8):703-718. doi:
709 10.1016/S2213-8587(20)30129-7
- 710
- 711 Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience
712 Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol*
713 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
- 714
- 715 Kristensen DM, Lesné L, Le Fol V, Desdoits-Lethimonier C, Dejuq-Rainsford N, Leffers H,
716 Jégou B (2012) Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin
717 are anti-androgenic in the rat foetal testis. *Int J Androl* 35(3):377-84. doi: 10.1111/j.1365-
718 2605.2012.01282.x
- 719
- 720 Lacouture A, Lafront C, Peillex C, Pelletier M, Audet-Walsh É (2021) Impacts of endocrine-
721 disrupting chemicals on prostate function and cancer. *Environ Res* 204:112085. doi:
722 10.1016/j.envres.2021.112085
- 723
- 724 Mandrup KR, Johansson HK, Boberg J, Pedersen AS, Mortensen MS, Jørgensen JS,
725 Vinggaard AM, Hass U (2015) Mixtures of environmentally relevant endocrine disrupting
726 chemicals affect mammary gland development in female and male rats. *Reprod Toxicol*
727 54:47-57. doi: 10.1016/j.reprotox.2014.09.016
- 728
- 729 Mendes LO, Amorim JP, Teixeira GR, Chuffa LG, Fioruci BA, Pimentel TA, de Mello W Jr,
730 Padovani CR, Pereira S, Martinez M, Pinheiro PF, Oliani SM, Martinez FE (2011) Masts
731 cells and ethanol consumption: interactions in the prostate, epididymis and testis of UChB rats.
732 *Am J Reprod Immunol.* 66(3):170-8. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00958.x
- 733
- 734 Mendes LO, Scarano WR, Rochel-Maia SS, Fioruci-Fontaneli BA, Chuffa LGA, Anselmo-
735 Franci JA, Martinez FE, et al. (2015) Androgen therapy reverses injuries caused by ethanol
736 consumption in the prostate: Testosterone as a possible target to ethanol-related disorders.
737 *Life Sci* 120:22–30
- 738
- 739 Montes GS, Krisztán RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourão PA, Junqueira LC (1980)
740 Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry*
741 65(2):131-41. doi: 10.1007/BF00493161
- 742

- 743 Montironi R, Santinelli A, Mazzucchelli R (2002) Prostatic intraepithelial neoplasia and
744 prostate cancer. *Panminerva Med* 44(3):213-20. PMID: 12094135.
745
- 746 Montironi R, Mazzucchelli R, Santinelli A, Scarpelli M, Beltran AL, Bostwick DG (2005)
747 Incidentally detected prostate cancer in cystoprostatectomies: pathological and morphometric
748 comparison with clinically detected cancer in totally embedded specimens. *Hum Pathol*
749 36(6):646-54. doi: 10.1016/j.humpath.2005.03.018
750
- 751 Motrich RD, Salazar FC, Bresler ML, Mackern-Oberti JP, Godoy GJ, Olivera C, Paira DA,
752 Rivero VE (2018) Implications of prostate inflammation on male fertility. *Andrologia*
753 50(11):e13093. doi: 10.1111/and.13093
754
- 755 Peixoto AR, Santos TM, Brandt JZ, Delella FK, Gonçalves BF, Campos SG, Taboga SR,
756 Favaro WJ, Domeniconi RF, Scarano WR (2016) Gestational and lactational exposition to Di-
757 N-butyl-phthalate (DBP) increases inflammation and preneoplastic lesions in prostate of
758 wistar rats after carcinogenic N-methyl-N-nitrosourea (MNU) plus testosterone protocol.
759 *Environ Toxicol* 31(10):1185-95. doi: 10.1002/tox.22126
760
- 761 Prins GS (1992) Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat
762 prostate androgen receptor expression. *Endocrinol* 130(6):3703-3714. doi:
763 10.1210/endo.130.6.1597166
764
- 765 Prins GS, Birch L, Tang WY, Ho SM (2007) Developmental estrogen exposures predispose to
766 prostate carcinogenesis with aging. *Rep Toxicol* 23(3): 374-382
767
- 768 Pu Y, Wang W, Al-Rubaiee M, Gayen SK, Xu M (2012) Determination of optical coefficients
769 and fractal dimensional parameters of cancerous and normal prostate tissues. *Appl Spectrosc*
770 66(7):828-34. doi: 10.1366/11-06471
771
- 772 Pylkkänen L, Mäkelä S, Valve E, Härkönen P, Toikkanen S, Santti R (1993) Prostatic
773 dysplasia associated with increased expression of c-myc in neonatally estrogenized mice. *J*
774 *Urol* 149(6): 1593-1601. doi: 10.1016/s0022-5347(17)36458-3
775
- 776 Sáttolo S, Carvalho CAF, Cagnon VHA (2004) Influence of hormonal replacement on the
777 ventral lobe of the prostate of rats (*Rattus norvegicus albinus*) submitted to chronic ethanol
778 treatment. *Tissue Cell* 36(6): 417–430
779
- 780 Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, de Campos SG, Júnior LA, Felisbino SL, Anselmo-
781 Franci JA, Taboga SR, Kempinas Wde G (2009) Long-term effects of developmental
782 exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory
783 disorders and a possible role of androgens. *Toxicology* 262(3):215-23. doi:
784 10.1016/j.tox.2009.06.011
785
- 786 Scarano WR, Pinho CF, Pissinatti L, Gonçalves BF, Mendes LO, Campos SGP (2018) Cell
787 junctions in the prostate: an overview about the effects of Endocrine Disrupting Chemicals
788 (EDCS) in different experimental models. *Reprod Toxicol* 81:147–154.
789
- 790 Scarano WR, Bedrat A, Alonso-Costa LG, Aquino AM, Fantinatti B, Justulin LA, Barbisan
791 LF, Freire PP, Flaws JA, Bernardo L (2019) Exposure to an Environmentally Relevant

- 792 Phthalate Mixture during Prostate Development Induces MicroRNA Upregulation and
793 Transcriptome Modulation in Rats. *Toxicol Sci* 171(1): 84–97. doi: 10.1093/toxsci/kfz141
794
- 795 Schneider S, Kaufmann W, Strauss V, van Ravenzwaay B (2011) Vinclozolin: A feasibility
796 and sensitivity study of the ILSI-HESI F1-extended one-generation rat reproduction protocol.
797 *Regul Toxicol Pharmacol* 59(1):91–100. doi: 10.1016/j.yrtph.2010.09.010
798
- 799 Seandel M, Noack-Kunmann K, Zhu D, Aimes RT, Quigley JP (2001) Growth factor
800 induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood*
801 97(8): 2323–32. doi: 10.1182/blood.v97.8.2323
802
- 803 Sfanos KS, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM (2018) The inflammatory
804 microenvironment and microbiome in prostate cancer development. *Nat Rev Urol* 15(1): 11–
805 24
806
- 807 Shoulders MD, Raines RT (2009) Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*
808 78:929–58
809
- 810 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataramet I, Jemal A, Bray F (2021)
811 Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality
812 Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer J Clin* 71(3): 209–249
813
- 814 Stukenborg JB, Mitchell RT, Söder O (2021) Endocrine disruptors and the male reproductive
815 system. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 35(5):101567. doi:
816 10.1016/j.beem.2021.101567
817
- 818 Taboga SR, Santos AB, Rocha A, Vidal BC, Mello MLS (2003) Nuclear phenotypes and
819 morphometry of human secretory prostatic cells: a comparative study of benign and malignant
820 lesions in Brazilian patients. *Caryologia* 56:313–320
821
- 822 Tambasco M, Costello BM, Kouznetsov A (2009) Quantifying the architectural complexity of
823 microscopic images of histology specimens. *Micron* 40(4):486–494.
824 <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.12.004>
825
- 826 Wang X, Wang Y, Song Q, Wu J, Zhao Y, Yao S, Sun Z, Zhang Y (2017) In utero and
827 lactational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate increased the susceptibility of prostate
828 carcinogenesis in male offspring. *Reprod Toxicol* 69:60–67. doi:
829 10.1016/j.reprotox.2017.01.008
830
- 831 Waliszewski P, Wagenlehner F, Gattenlöhner S, Weidner W (2015) On the relationship
832 between tumor structure and complexity of the spatial distribution of cancer cell nuclei: A
833 fractal geometrical model of prostate carcinoma. *Prostate*. 75(4):399–414. doi:
834 10.1002/pros.22926
835
- 836 Wasiuk A, De Vries VC, Hartmann K, Roers A, Noelle RJ (2009) Mast cells as regulators of
837 adaptive immunity to tumours. *Clin Exp Immunol* 155(2): 140–146
838
- 839 Weibel ER, Paumgartner D (1978) Integrated stereological and biochemical studies on
840 hepatocytic membranes. II. Correction of section thickness effect on volume and surface
841 density estimates. *J Cell Biol* 77(2): 584–597

842

843 Welsh M, Saunders PT, Fisker M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, Sharpe RM (2008)
844 Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization,
845 disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 118(4):1479-90

846

847 Xia B, Wang Y, Wang X, Wu J, Song Q, Sun Z, Zhang Y (2018) In utero and lactational
848 exposure of DEHP increases the susceptibility of prostate carcinogenesis in male offspring
849 through PSCA hypomethylation. *Toxicol Lett* 292:78–84. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.04.022

850

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) E COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)

22/11/2021 02:04

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPD - Projeto de Pesquisa Docente

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO DA TRIÁDE EXPOSIÇÃO-GENE-DOENÇA: EFEITOS DE UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS BASEADA NA EXPOSIÇÃO HUMANA SOBRE O MICROAMBIENTE PROSTÁTICO.", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6034 e tendo como participante(s) MARIA LUIZA SILVA RICARDO (discente), WELLERSON RODRIGO SCARANO (participante externo), ANTHONY CESAR DE SOUZA CASTILHO (docente), LEONARDO DE OLIVEIRA MENDES (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.

Vigência do projeto: 02/2020 a 11/2023.

ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Ratos Sprague-Dawley	36	250 gramas	60 dias	F	CEMIB - UNICAMP
Ratos Sprague-Dawley	12	300 gramas	90 dias	M	CEMIB - UNICAMP

Presidente Prudente, 2 de Abril de 2020.

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

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

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18 3229-2079 - cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 3229-2079 - cep@unoeste.br
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - 183229-2079 - ceua@unoeste.br

valide este documento em www.unoeste.br/spp informando o código de segurança **cdbe30a0fee43e505e38fc24fa8bb620**

ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH

Instructions for Authors

General Information

Note on preprint server:

Please add a note to the manuscript cover letter declaring whether you have submitted your manuscript to a preprint server. Please add one of the following sentences:

“I have submitted my manuscript to a preprint server before submitting it to *Environmental Science and Pollution Research*” or

“I have not submitted my manuscript to a preprint server before submitting it to *Environmental Science and Pollution Research*”.

Types of Papers

Peer-reviewed contributions:

- Research Articles (full papers)
- Short Original Communications and Discussion Articles
- Review Articles
- Research Communications

Please ensure that the length of your paper is in harmony with your research area and with the science presented.

All papers – excluding Editorials, Letters to the Editor, Conference Reports – are subject to peer-review by a minimum of two and a maximum of three experts.

While submitting your paper you will be asked for three potential reviewers. Indicating three reviewers is mandatory.

- To authors from non-English language countries:

To have the best possible pre-requisition for the review process, please ask a native speaker to check the quality of the English, before you submit the complete paper.

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
 - Please avoid acronyms in the title of your article
 - For local studies, please indicate the name of the region and country in the title.
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of about 10 to 15 lines.

Keywords

Please provide 6 to 8 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Additional Information Text Formatting

All manuscripts should be formatted containing continuous line numbering. Use the page and line numbering function to number the pages.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

Specific Remarks

- Online documents: wikipedia documents are not acceptable as references.
- LanguageReferences should be in English with an appropriate title in English. If it's in a different language the language should be indicatedZhu J, Wu F-C, Deng Q-J, Shao S-X, Mo C-L, Pan X-L, Li W, Zhang R-Y (2009) Environmental characteristics of water near the Xikuangshan antimony mine. *Acta Scientiae Circumstantiae* 29:655-661 (in Chinese)

Statements & Declarations

The following statements must be included in your submitted manuscript under the heading 'Statements and Declarations'. This should be placed after the References section. Please note that submissions that do not include required statements will be returned as incomplete.

Funding

Please describe any sources of funding that have supported the work. The statement should include details of any grants received (please give the name of the funding agency and grant number).

Example statements:

“This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...]). Author A.B. has received research support from Company A.”

“The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.”

Competing Interests

Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work.

Example statements:

“Financial interests: Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company N. Author D has received travel support from Company O. Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M and Company N.”

“The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.”

Please refer to the “Competing Interests” section below for more information on how to complete these sections.

Author Contributions

Authors are encouraged to include a statement that specifies the contribution of every author to the research and preparation of the manuscript.

Example statement:

“All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.”

Please refer to the “Authorship Principles ” section below for more information on how to complete this section.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

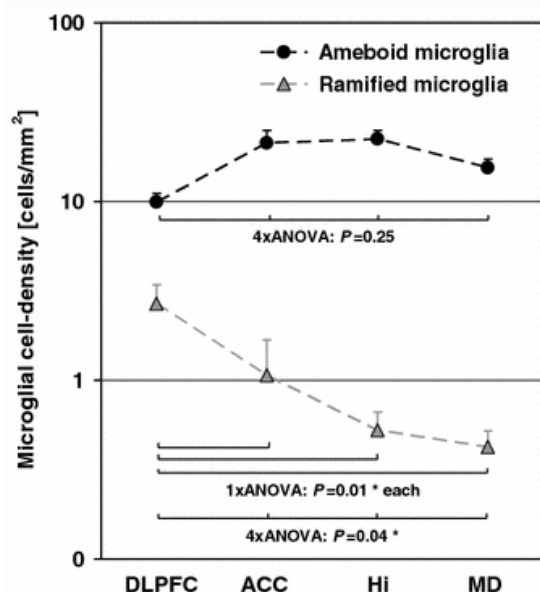
Artwork

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

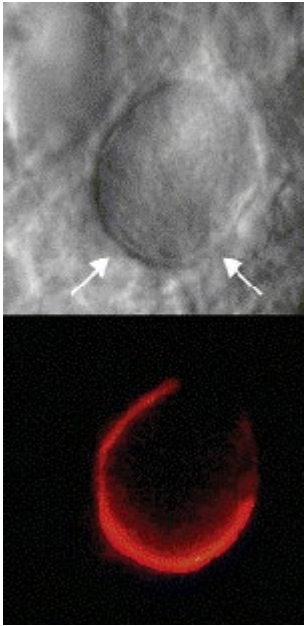
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



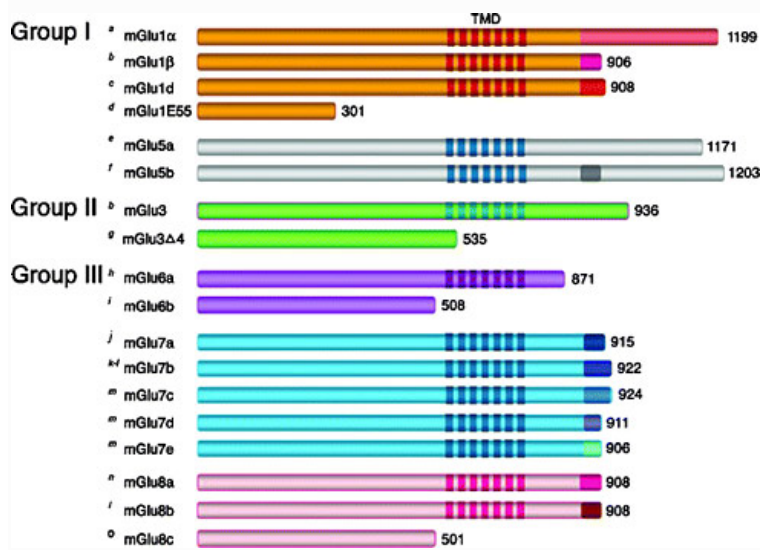
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for print and online publication.
- Color illustrations should be submitted as RGB.

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
- High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

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:

- Getting a fast, free online grammar check.
- Asking a colleague who is proficient in English 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.

[Free online grammar check](#)

[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.

Ethical Responsibilities 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 is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially 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 concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- 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 (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

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

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.

- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

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

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the manuscript 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:
 - an erratum/correction may be placed with the article
 - an expression of concern may be placed with the article
 - or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

- The author's institution may be informed

- A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;

- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018](#)

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;

- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

[Example: CRediT taxonomy:](#)

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

[A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006](#)

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

Important note:

Please note that – contrary to the text above – according to the policy of ESPR, any addition/removal of authors or change in order list are prohibited during all the review process. The original authorship must remain the same during all the review process.

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.

Competing Interests

Authors are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could

reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. 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.

Editorial Board Members and Editors are required to declare any competing interests and may be excluded from the peer review process if a competing interest exists. In addition, they should exclude themselves from handling manuscripts in cases where there is a competing interest. This may include – but is not limited to – having previously published with one or more of the authors, and sharing the same institution as one or more of the authors. Where an Editor or Editorial Board Member is on the author list they must declare this in the competing interests section on the submitted manuscript. If they are an author or have any other competing interest regarding a specific manuscript, another Editor or member of the Editorial Board will be assigned to assume responsibility for overseeing peer review. These submissions are subject to the exact same review process as any other manuscript. Editorial Board Members are welcome to submit papers to the journal. These submissions are not given any priority over other manuscripts, and Editorial Board Member status has no bearing on editorial consideration.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

Funding: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

Employment: Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

Financial interests: Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

Non-financial interests: In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management

relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential competing interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is **not added** to the manuscript itself. Under 'summary of requirements' (see below) funding information should be included in the '**Declarations**' section.

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Funding' and/or 'Competing interests'. Other declarations include Ethics approval, Consent, Data, Material and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) conflicts and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

Examples of statements to be used when funding has been received:

- Partial financial support was received from [...]
- The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].
- This study was funded by [...]
- This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

Examples of statements to be used when there is no funding:

- The authors did not receive support from any organization for the submitted work.
- No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.
- No funding was received for conducting this study.
- No funds, grants, or other support was received.

Examples of statements to be used when there are interests to declare:

- **Financial interests:** Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company Wand owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.

Non-financial interests: Author C is an unpaid member of committee Z.

- **Financial interests:** The authors declare they have no financial interests.

Non-financial interests: Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.

- **Financial interests:** Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.

Non-financial interests: none.

- **Financial interests:** Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.

Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

- The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.
- The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.
- All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.
- The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Research Data Policy

This journal operates a [type 1 research data policy](#). The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

[List of Repositories](#)

[Research Data Policy](#)

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

[DataCite](#)

If the journal that you're submitting to uses double-blind peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also blinded. There are [data repositories that can assist with this](#) and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Authors who need help understanding our data sharing policies, help finding a suitable data repository, or help organising and sharing research data can access our [Author Support portal](#) for additional guidance.

After Acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Once typesetting is complete, you will receive a link asking you to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article as well as arrange rights and payment of any associated publication cost.

Once you have completed this, your article will be processed and you will receive the proofs.

Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

[Open Choice](#)

[Funding and Support pages](#)

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

Open access publishing

To find out more about publishing your work Open Access in Environmental Science and Pollution Research, including information on fees, funding and licenses, visit our [Open access publishing page](#).