



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

**ALESSANDRA GOMES DUARTE RODRIGUES**

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO Á MISTURAS QUÍMICAS DE DESREGULADORES  
ENDÓCRINOS DESDE A GESTAÇÃO ATÉ A IDADE ADULTA NO CORAÇÃO DE  
RATOS WISTAR**

Presidente Prudente - SP  
2023



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

**ALESSANDRA GOMES DUARTE RODRIGUES**

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO Á MISTURAS QUÍMICAS DE DESREGULADORES  
ENDÓCRINOS DESDE A GESTAÇÃO ATÉ A IDADE ADULTA NO CORAÇÃO DE  
RATOS WISTAR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Francis  
Lopes Pacagnelli

Presidente Prudente - SP  
2023

### Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

616.12  
R696i

Rodrigues, Alessandra Gomes Duarte.

Impacto da exposição á misturas químicas de desreguladores endócrinos desde a gestação até a idade adulta no coração de ratos wistar / Alessandra Gomes Duarte Rodrigues ; orientadora Francis Lopes Pacagnelli – Presidente Prudente, 2023.

46 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

1. Atrofia cardíaca. 2. Desregulador endócrino. 3. Estresse oxidativo. I. Pacagnelli, Francis Lopes, orient. II. Título.

**ALESSANDRA GOMES DUARTE RODRIGUES**

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO Á MISTURAS QUÍMICAS DE DESREGULADORES  
ENDÓCRINOS DESDE A GESTAÇÃO ATÉ A IDADE ADULTA NO CORAÇÃO DE  
RATOS WISTAR**

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

Presidente Prudente, 06 de março de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli (Orientadora)  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL  
Londrina - PR

---

Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu cunhado e compadre José Carlos de Jesus Arantes, que partiu precocemente durante o meu mestrado. Foi um grande incentivador para que eu iniciasse a faculdade de Medicina e o Mestrado. Deixou um vazio enorme em nossos corações. Saudades.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus pelo dom da vida e por me dar força e fé para concluir este estudo.

A meus pais (Roberto e Nivaldete) pela presença marcante e incentivadora em minha vida.

A meu querido esposo Flávio Henrique pelo amor e zelo a nossa família.

A meus filhos: Bruno, Leonardo e Isabelle que são a minha inspiração para prosseguir.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Francis Lopes Pacagnelli por sua dedicação e competência.

Ao Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes pela contribuição neste estudo.

A Profa. Dra. Glauro Scantamburlo Alves Fernandes da Universidade Estadual de Londrina pela contribuição em realizar a Análise do Estresse Oxidativo.

Aos acadêmicos de medicina pela participação ativa durante o estudo.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que fizeram parte desta etapa decisiva em minha vida.

**“Quem a tudo renuncia, tudo receberá”**  
São Francisco de Assis

## RESUMO

### **Impacto da exposição á misturas químicas de desreguladores endócrinos desde a gestação até a idade adulta no coração de ratos Wistar**

Os desreguladores endócrinos (DE) são substâncias que alteram a biossíntese hormonal e promovem efeitos tóxicos ocasionando doenças cardiovasculares. Entretanto, os efeitos da associação de vários DE a longo prazo na remodelação cardíaca não foram elucidados. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos crônicos de uma mistura de DE na remodelação cardíaca de ratos nos aspectos relacionados a estrutura, função e nos marcadores de estresse oxidativo. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em 2 grupos experimentais: Grupo CT (veículo: óleo de milho, por gavagem) e Grupo DE Mix: receberam 32,11mg/kg/dia da mistura constituída de doze DE (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 de DE até os 220 dias de idade, e após foram eutanasiados. Após esse período foram realizadas a análise ecocardiográfica, histopatológica e análise do estresse oxidativo. Não houve alterações da função sistólica (encurtamento do endocárdio: CT-  $44,44 \pm 3,12$  % vs. DE Mix-  $44,70 \pm 3,32$ %) e diastólica do ventrículo esquerdo (Onda E/A: CT-  $3,37 \pm 1,15$  vs. DE Mix-  $3,68 \pm 1,20$ ). Foi possível observar uma diminuição significativa na área dos cardiomiócitos (CT-  $347 \pm 91,62$   $\mu\text{m}^2$  vs. DE Mix-  $202 \pm 72,70$   $\mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,01$ ) e não houve alterações da dimensão fractal. Os níveis de peroxidação lipídica estavam reduzidos no Grupo DE Mix (CT-  $5,73 \pm 0,36$  vs. DE Mix-  $5,17 \pm 0,60$  nmol/mg de proteína,  $p = 0,008$ ). As enzimas superóxido dismutase (SOD, CT-  $10,18 \pm 9,25$  vs. DE Mix-  $4,93 \pm 1,48$  U/ mg de proteína,  $p = 0,10$ ) e a Glutathiona reduzida (GSH, CT-  $28,47 \pm 15,17$  vs. DE Mix-  $39,66 \pm 43,85$   $\mu\text{M}$ / mg de proteína,  $p = 0,53$ ) não se alteraram. Houve diminuição da enzima Glutathiona -S- Transferase (GST, CT-  $138,3 \pm 28,44$  vs. DE Mix-  $113,8 \pm 48,44$ , mM/ mg de proteína,  $p = 0,01$ ). A mistura de DE de forma crônica, desde a gestação, teve impacto negativo no microambiente cardíaco, promovendo atrofia cardíaca e alterações nos marcadores do estresse oxidativo, sem promover modificações funcionais.

**Palavras-chave:** Atrofia cardíaca; Desregulador endócrino; Estresse oxidativo; Sistema cardiovascular; Fractal.



## ABSTRACT

### **The impact of a mixture endocrine-disrupting chemical exposure during gestational and adult period in the heart in wistar rats**

Endocrine disruptors (ED) are substances that alter hormonal biosynthesis and promote toxic effects, causing cardiovascular diseases. However, the long-term effects of association of several ND on cardiac remodeling have been elucidated. The aim of this study was to evaluate the chronic effects of a DE mixture on cardiac remodeling in aspects related to structure, function and oxidative stress. Pregnant females of the Sprague-Dawley strain were divided into 2 experimental groups: CT Group (vehicle: corn oil, by gavage) and DE Mix Group: received 32.11mg/kg/day of a mixture consisting of twelve DE (phthalates, pesticides, u.v. filters, bisphenol A, butylparaben) diluted in corn oil (2ml/kg), by gavage. Pregnant or lactating rats received the treatment from gestational day 7 (DG7) until postnatal day 21 (DPN21). After weaning, at DPN22, the male offspring of the F1 generation continued to receive the DE mixture until they were 220 days old, after which they were euthanized. After this period, echocardiographic and histopathological analysis and analysis of oxidative stress were performed. There were no changes in the systolic (endocardial shortening: CT-  $44.44 \pm 3.12$  % vs. DE Mix-  $44.70 \pm 3.32$ ) and diastolic function of the left ventricle (E/A wave: CT-  $3.37 \pm 1.15$  vs. DE Mix-  $3.68 \pm 1.20$ ). It was possible to observe a significant decrease in the area of cardiomyocytes (CT-  $347 \pm 91.62 \mu\text{m}^2$  vs. DE Mix-  $202 \pm 72.70 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.01$ ) and there were no changes in the fractal dimension. Lipid peroxidation levels were reduced in the DE Mix Group (CT-  $5.73 \pm 0.36$  vs. DE Mix-  $5.17 \pm 0.60$  nmol/mg of protein,  $p = 0.008$ ). The enzyme superoxide dismutase (SOD, CT-  $10.18 \pm 9.25$  vs. DE Mix-  $4.93 \pm 1.48$  U/ mg of protein,  $p = 0.10$ ) and reduced Glutathione (GSH, CT-  $28.47 \pm 15.17$  vs. DE Mix-  $39.66 \pm 43.85 \mu\text{M/mg}$  protein,  $p = 0.53$ ) did not change. There was a decrease in Glutathione -S- Transferase (GST, CT-  $138.3 \pm 28.44$  vs. DE Mix-  $113.8 \pm 48.44$ , mM/mg of protein,  $p = 0.01$ ). The chronic mixture of ED, since pregnancy, had a negative impact on the cardiac microenvironment, promoting cardiac atrophy and changes in oxidative stress markers, without promoting functional changes.

**Keywords:** Cardiac atrophy; Endocrine disruptor; Oxidative stress; Cardiovascular system; Fractal.

## LISTA DE SIGLAS

AE	-	Átrio Esquerdo
AO	-	Aórtico
ATs	-	Átrios
CAT	-	Catalase
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	-	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	-	Controle
DE	-	Desregulador Endócrino
DE Mix	-	Mistura de Desregulador Endócrino
DDVE	-	Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo
DSVE	-	Diâmetro Sistólico do Ventrículo Esquerdo
E/A	-	Onda E/Onda A
ECM	-	Matriz Nuclear e Extracelular
EDPP	-	Espessura Diastólica da Parede Posterior
EDSIV	-	Espessura da Parede Septal Diastólica
% ENC END	-	Porcentagem de Encurtamento do Endocárdio
EPA	-	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ERO	-	Espécies Reativas de Oxigênio
FC		Frequência Cardíaca
FE		Fração de Ejeção
GCP	-	Grupo Carbonila de Proteína
GSH	-	Glutathiona Reduzida
GST	-	Glutathiona
S	-	Transferase
HE	-	Hematoxilina e Eosina
LPO	-	Lipoperoxidação
MDA	-	Malondialdeído
NBT	-	Nitroblue -Tetrazólio
PCF	-	Peso-Corporal Final
PEE	-	Porcentagem de Encurtamento do Endocárdio
PEM	-	Porcentagem de Encurtamento do Mesocárdio
SOD	-	Enzima Superóxido Dismutase

TBARS	-	Ácido Tiobarbitúrico
TRIV	-	Tempo de Relaxamento Isovolumétrico
VD	-	Ventrículo Direito
VE	-	Ventrículo Esquerdo
VEPP	-	Velocidade de Encurtamento da Parede Posterior

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do Desenho Experimental.....	19
Figura 2 -	Figuras ilustrativas da análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo: diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico do VE (DSVE) do Grupo CT, medidas das ondas E e A no Grupo CT, (c) diâmetro diastólico e sistólico do VE do Grupo DE Mix, (d) medidas das ondas E e A no Grupo DE Mix.....	25
Figura 3 -	Análise histopatológica do tecido cardíaco do Grupo CT (a) e Grupo DE Mix (b) coradas com Hematoxilina e Eosina. Aumento de 400X. Teste t não pareado. * $p < 0,05$ .....	27
Figura 4 -	Cortes histológicos de ventrículo esquerdo do Grupo CT e de animais submetidos a exposição de mistura de DE- Grupo DE Mix, corados com HE (a e c). Sendo que (b e d) correspondem as imagens em HE após processo de binarização, onde é possível observar que o núcleo aparece em preto, enquanto o resto da célula em branco. O Grupo DE Mix não apresentou mudanças na fractabilidade (e). Teste t não pareado.....	28
Figura 5 -	Quantificação de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. (a) Comparação dos níveis de malondialdeído entre os Grupos CT e DE Mix, como indicativo de estresse oxidativo (peroxidação lipídica). (b) Níveis de GSH entre os grupos. (c) Quantificação da atividade enzimática de GST e (d) SOD entre os grupos. Teste t não pareado ou Mann Whitney.* $p < 0.05$ vs. CT.....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da mistura, consumo humano individual justado dos compostos químicos e misturas 100x19.....	18
Tabela 2 - Dados estruturais e funcionais ecocardiográficos. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico.....	24
Tabela 3 - Dados anatômicos.....	26

## SUMÁRIO

<b>Artigo original.....</b>	<b>14</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>16</b>
<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>17</b>
<b>Resultados Ecocardiograma .....</b>	<b>23</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>29</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>33</b>
<b>Referências.....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO A -- Aprovação Ética .....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO B -- Normas da Revista Environmental Science and Pollution Research.....</b>	<b>41</b>

**Artigo original**

THE IMPACT OF A MIXTURE ENDOCRINE-DISRUPTING CHEMICAL EXPOSURE DURING GESTATIONAL AND ADULT PERIOD IN THE HEART IN WISTAR RATS

GESTATIONAL AND ADULT EXPOSURE OF A MIXTURE ENDOCRINE-DISRUPTING IMPAIRS THE DEVELOPMENT OF THE HEART IN WISTAR RAT

Alessandra Gomes Duarte Rodrigues<sup>1</sup>, Murilo Perreti Silva<sup>1</sup>, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes<sup>2</sup>, Ivana Regina da Costa<sup>2</sup>, Giovanna Fachetti Frigoli<sup>2</sup>, Leonardo de Oliveira Mendes<sup>1</sup>, Charles Ulloffo do Nascimento<sup>3</sup>, Raissa de Oliveira Mantovani<sup>1,4</sup>, Rejane Batista Brinholi Victorino da Silva<sup>1</sup>, Ana Paula Coelho Figueira Freire<sup>5</sup>, Francis Lopes Pacagnelli<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

<sup>3</sup> Cuore, Presidente Prudente, Brazil.

<sup>4</sup> Faculdades da Dracena, UNIFADRA, Dracena, SP, Brazil.

<sup>5</sup> Central Washington University, Ellensburg, United States

Autor de Correspondência: Francis Lopes Pacagnelli, UNOESTE, Raposo Tavares Highway, Km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. CEP: 19.067-175. Telefone: +55 (18) 3229-2000

Artigo formatado segundo as normas do periódico Environmental Science and Pollution Research (ISBN 09441344, A2 – Medicina 2, Fator Impacto: 5.1)

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar se a exposição a uma mistura de Desreguladores Endócrinos (DE) desde a vida intrauterina até a vida adulta afeta parâmetros cardíacos de ratos machos. Ratas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em 2 grupos experimentais: Grupo CT (veículo: óleo de milho, por gavagem) e Grupo DE Mix: receberam 32,11mg/kg/dia da mistura constituída de doze DE (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 de DE até os 220 dias de idade. Após tratamento, os animais foram submetidos a análises ecocardiográficas, seguida de eutanásia, com coleta de tecido cardíaco para avaliação histopatológicas e de estresse oxidativo. Não houve alterações da função sistólica (encurtamento do endocárdio: CT-  $44,44 \pm 3,12$  % vs. DE Mix-  $44,70 \pm 3,32$ ) e diastólica do ventrículo esquerdo (Onda E/A: CT-  $3,37 \pm 1,15$  vs. DE Mix-  $3,68 \pm 1,20$ ,  $p > 0,05$ ). Foi possível observar uma diminuição significativa na área dos cardiomiócitos (CT-  $347 \pm 91,62 \mu\text{m}^2$  vs. DE Mix-  $202 \pm 72,70 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,01$ ), sem alterações da dimensão fractal. Os níveis de peroxidação lipídica estavam reduzidos no Grupo DE Mix (CT-  $5,73 \pm 0,36$  vs. DE Mix-  $5,17 \pm 0,60$  nmol/mg de proteína,  $p = 0,008$ ). A enzima superóxido dismutase (SOD, CT-  $10,18 \pm 9,25$  vs. DE Mix-  $4,93 \pm 1,48$  U por mg de proteína,  $p = 0,10$ ) e a Glutathione reduzida (GSH, CT-  $28,47 \pm 15,17$  vs. DE Mix-  $39,66 \pm 43,85 \mu\text{M}$  por mg de proteína,  $p = 0,53$ ) não se alteraram. Houve diminuição da Glutathione -S- Transferase (GST, CT-  $138,3 \pm 28,44$  vs. DE Mix-  $113,8 \pm 48,44$ , mM por mg de proteína,  $p = 0,01$ ). A mistura de DE desde a gestação até a vida adulta, teve impacto negativo no microambiente cardíaco, promovendo atrofia cardíaca e alterações nos marcadores do estresse oxidativo, sem promover modificações funcionais.

**Palavras Chaves:** Atrofia cardíaca; estresse oxidativo; gestação; sistema cardiovascular; fractal.



## Introdução

Os desreguladores endócrinos (DE) são compostos químicos sintéticos de origem exógena que interferem na biossíntese hormonal e incluem substâncias como plastificantes, dioxinas, agentes farmacêuticos, fungicidas, pesticidas e outros produtos de cuidados pessoais aos quais somos expostos diariamente por meio da inalação, ingestão ou contato dérmico (Kavlock et al. 1996; Soto and Sonnenschein 2010; Deng et al. 2019a; Brehm, Flaws 2019).

A frequente exposição causada pelos DE está relacionada com o surgimento de lesões no sistema cardiovascular, com o desenvolvimento de doenças metabólicas (diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, síndrome metabólica, obesidade) Wang et al. 2020, 2021, e cardiovasculares (hipertensão arterial, aterosclerose, alterações coronarianas e infarto agudo do miocárdio) (Petraakis et al. 2017; Amara et al. 2019; Prasanth et al. 2009). Os DE podem causar remodelação cardíaca, que é caracterizada por alterações estruturais, morfológicas e moleculares no coração até os vasos, que podem afetar o funcionamento deste sistema (Cohn Jay N et al. 2000; Deng et al. 2019a). Entretanto, os estudos tem focado nos compostos isolados ou em pequenos grupos, e em menores períodos de exposição. Deng e colaboradores (2019<sup>a</sup>), mostrou que a exposição contínua ao DEHP nas doses de 0,1,1,10mg/kg/dia em camundongos machos de 5 a 6 semanas, por 6 semanas, aumentou a pressão arterial, espessamento do septo intraventricular e parede ventricular, um indicativo de alteração da remodelação cardíaca.

Para mimetizar uma exposição ambiental mais realística Christiansen e colaboradores (2012) descreveram uma mistura de 13 compostos químicos, cuja composição envolve ftalatos, 5 pesticidas; e o metabólito do pesticida DDT, diclorodifenil-dicloroetileno (p,p'-DDE). (Christiansen et al. 2012; Axelstad et al. 2014; Isling et al. 2014; Boberg et al. 2015). Esses 8 compostos são caracterizados por possuírem, predominantemente, propriedades anti-androgênicas, sendo a classe dos pesticidas a mais predominante para essa característica. Além disso, a mistura também contém quatro substâncias predominantemente estrogênicas: dois filtros u.v., o metoxinamato de octila (OMC) e o 4-metil-benzidileno cânfora (4-MBC); o composto fenólico bisfenol A (BPA) e o preservativo antifúngico butilparabeno. A mistura também inclui a droga paracetamol, previamente descrita como uma droga anti-androgênica.

Diferentemente dos estudos que abordam a exposição à DE isolados e a exposição a curto período, esse estudo tem como objetivo avaliar os efeitos de uma mistura de DE na remodelação cardíaca nos aspectos relacionados a função, estrutura, e no estresse oxidativo de ratos expostos desde a vida intrauterina até a vida adulta.

## **Materiais e métodos**

### **Animais e Ambiente de Experimentação**

24 fêmeas adultas (120 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) e 12 machos adultos (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) da linhagem Sprague-Dawley, foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), e mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos da UNOESTE, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C a 25°C). Todos os animais receberam ração comercial livre de fitoestrógenos (NUVILABCR1/NuvitalPR) e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa e bico metálicos com capacidade para 500 mL. Água e ração foram fornecidas ad libitum. Os animais foram distribuídos na proporção de duas a três fêmeas e um macho adulto (para acasalamento) por gaiola de polipropileno de 41x34x16cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas 2 vezes por semana. Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições de umidade relativa do ar ( $55 \pm 10$ ) e exaustão do ar contínua. Os procedimentos de manuseio, administração de drogas, anestesia e eutanásia dos animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNOESTE (Protocolo CEUA 6034) e seguiram o Protocolo ARRIVE.

### **Delineamento Experimental**

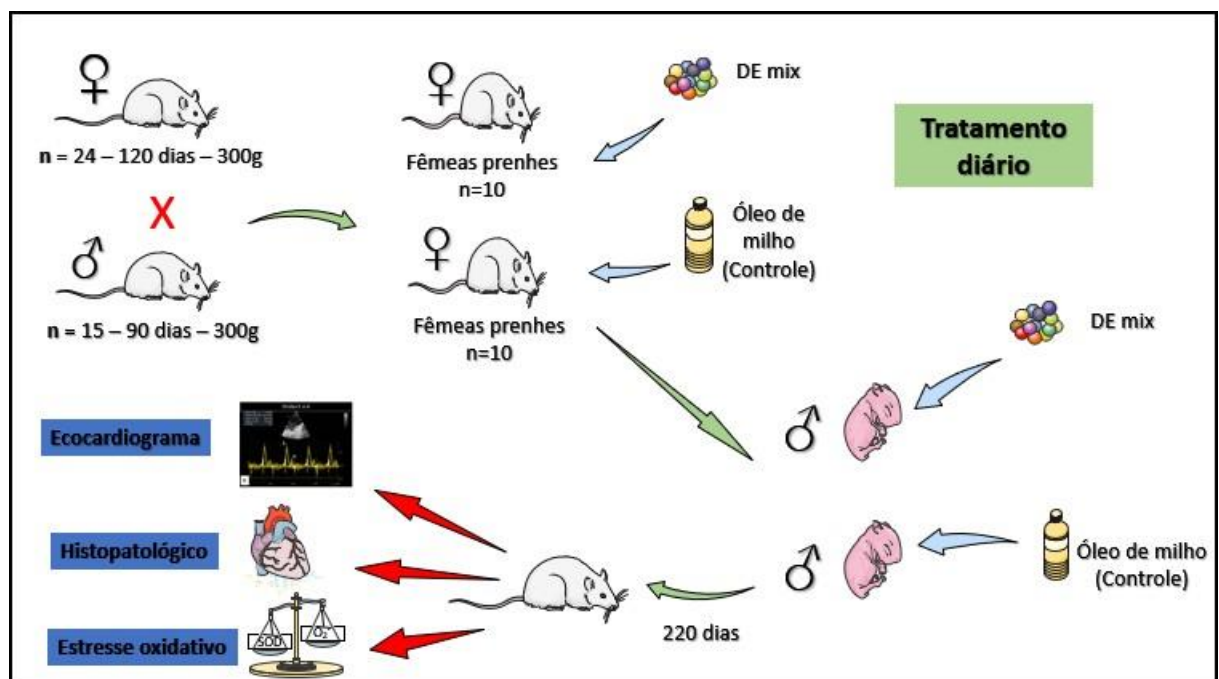
Acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, onde foram colocadas de duas a três fêmeas na caixa do macho. O dia zero de prenhez/gestacional (DG0) foi determinado pela presença da cabeça de espermatozóide no esfregaço vaginal e a citologia vaginal positiva da fase de estro. As fêmeas identificadas como prenhes foram mantidas individualmente nas gaiolas e divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais (n=10/grupo): Grupo DE MIX: 30,11 mg/kg/dia da mistura de DE diluídos em óleo de milho (2 ml/kg); Grupo Controle (CT): óleo de milho, ambos administrados via gavagem. Os animais do grupo DE Mix receberam uma mistura de DE (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) desenvolvida por Christiansen et al. (2012) e reproduzida por Axelstad et al. (2014), Isling et al. (2014), Boberg et al. (2015), Mandrup et al. (2015) e Johansson et al. (2016). A composição da mistura é descrita detalhadamente na Tabela 1, adaptada de Christiansen et al. (2012).

**Tabela 1.** Composição da mistura, consumo humano individual justado dos compostos químicos e misturas 100x.

<b>Compostos químicos (Cas nº)</b>	<b>Consumo humano ajustado e escolhido como base para estudo das misturas (mg/kg de peso corpóreo ao dia)<sup>a</sup></b>	<b>Mistura 100x (mg/kg de peso corpóreo ao dia)</b>
DBP (175606-05-0)	0,01	1
DEHP (117-81-7)	0,02	2
Vinclozin (50-471-44-8)	0,009	0,9
Procloraz (67747-09-5)	0,014	1,4
Procimidona (32809- 16- 8)	0,015	1,5
Linuron (330-55-2)	0,0006	0,06
Epoxiconazol (133855-98-8)	0,01	1
p,p'-DDE (72- 55-9)	0,001	0,1
4-MBC (36861-47-9)	0,06	6
OMC (5466-77-3)	0,12	12
Bisfenol A (80-05- 07)	0,0015	0,15
Butilparabeno (94-26-8)	0,06	6
<b>Total (mg/kg)</b>	<b>0,32</b>	<b>32,11</b>

<sup>a</sup>Ver Christiansen et al. (2012) para informações detalhadas sobre as estimativas do consumo humano e para as concentrações ajustadas que foram escolhidas como base para a mistura.

O paracetamol foi retirado da mistura de DE devido o potencial hepatotóxico. Dessa forma ficando 12 componentes na mistura sendo uma adaptação em relação a composição original composta por 13 elementos. Foi aplicado o tratamento nas ratas prenhes/lactentes do dia gestacional 7 (DG7) até o dia pós-natal 21 (DPN21), nos mesmos períodos entre 8h à 10h. Estas foram mantidas em gaiolas individuais e pesadas em dias alternados para permitir o cálculo do volume da mistura de DE. Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi ajustado para 8 (4 fêmeas e 4 machos) afim de manter a proporção entre machos e fêmeas de 1:1. Ninhadas com número de filhotes inferior a sete não foram descartadas da pesquisa. Posteriormente no DPN 22 foi realizado o desmame dos filhotes machos, que foram alojados em caixas contendo 3 animais cada. Os animais continuaram recebendo o tratamento com a mistura completa de DE diariamente até os 220 dias de idade. Após 24 horas do último tratamento os animais (DPN 221) foram submetidos a análise ecocardiográfica e após submetidos à eutanásia por meio de aplicação intramuscular de uma mistura de anestésicos como ketamina ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , IP Dopalen®) e xilazina ( $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , IP, Anasedan®), seguido de exsanguinação por punção cardíaca. O coração foi dissecado, pesado e parte do VE foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer  $-80^\circ \text{C}$  para análises do estresse oxidativo. Outros fragmentos do VE foram colocados em solução fixadora para posteriores análises histopatológicas. Todas as análises foram feitas de forma cega. (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema do desenho experimental

### **Análise ecocardiográfica**

A avaliação ecocardiográfica foi realizada 24 horas após último tratamento, e para sua realização foi utilizado um ecocardiograma comercialmente disponível (General Electric Medical Systems, Vivid T8 Pro, Israel), equipado com uma sonda de multifrequência de 5 a 12 MHz. Os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de uma mistura de ketamina (50 mg kg<sup>-1</sup>, IP Dopalen®) e xilazina (0,5 mg kg<sup>-1</sup>, IP, Anasedan®). Uma visão de eixo curto paraesternal bidimensional do ventrículo esquerdo (VE) foi obtida no nível dos músculos papilares. Os traçados do modo M foram obtidos a partir de vistas de eixo curto do VE ou abaixo da ponta dos folhetos da válvula mitral e no nível da valva aórtica e do átrio esquerdo. As imagens em modo M do VE foram impressas em preto em uma impressora térmica (Sony UP-890MD), a uma velocidade de varredura de 100 mm/s. Todas as estruturas de VE foram medidas manualmente pelo mesmo observador. As medidas foram feitas a partir da média de pelo menos cinco ciclos cardíacos nos traçados M-mode. A Frequência Cardíaca (FC) foi avaliada e as seguintes variáveis estruturais foram medidas: diâmetro do átrio esquerdo (AE), espessura da parede diastólica posterior do VE, espessura da parede septal diastólica do VE (EDSIV) e diâmetro aórtico (AO). A massa ventricular esquerda foi calculada utilizando a fórmula [(DDVE + EDPP (espessura diastólica da parede posterior) + EDSIV) - DDVE] × 1,04. A espessura relativa da parede VE (Índice massa do VE) foi calculada pela fórmula  $2 \times \text{EDPP} / \text{DDVE}$ . A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes parâmetros: porcentagem de encurtamento do endocárdio (PEE), porcentagem de encurtamento do mesocárdio (PEM), velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). A função diastólica do VE foi avaliada pela velocidade de entrada mitral diastólica precoce e tardia (ondas E e A), Relação E/A e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV). Uma avaliação conjunta da função diastólica e sistólica do VE foi realizada pelo índice de desempenho miocárdico (Índice Tei), conhecido também como índice de performance miocárdica, calculado da seguinte forma: [(Tei-a (tempo de contração isovolumétrica + tempo de ejeção + tempo de relaxamento isovolumétrico) - Tei-b (tempo de contração isovolumétrica + tempo de ejeção + tempo de relaxamento isovolumétrico) ÷ Tei-b)]. O estudo foi complementado com avaliação por imagem de Doppler tissular da velocidade sistólica (TDIS'), diastólica precoce (E') e tardia (A') do anel mitral (velocidades médias das paredes laterais e septais) (Okoshi et al. 2004).

### **Análises anatômicas e histológicas**

Após o período experimental os ratos foram pesados (PCF), eutanasiados e o coração dissecado em ventrículo esquerdo (VE), átrios (ATs) e ventrículo direito (VD) e foram pesados. As relações VE/PCF, AT/PCF e VD/PCF foram utilizadas como índice de hipertrofia. Após isso as amostras do VE foram fixadas em formalina e a incorporação em blocos de parafina para obter 4 micrômetros de espessura dos cortes histológicos. Os cortes histológicos foram corados em lâmina com solução Hematoxilina-Eosina (HE); para a mensuração das áreas transversais dos cardiomiócitos foi utilizado o microscópio LEICA (modelo DM750, Alemanha) com a utilização do sistema de análise de imagem Leica Application Suite LAS 4.2.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EUA) (Matsubara et al. 2000; Oliveira Junior et al. 2013; Negrão et al. 2019).

Todas as imagens foram capturadas pela câmera de vídeo com a ampliação de 400x (objetiva de 40x). Quatro secções do ventrículo esquerdo foram obtidas de cada animal em campos diferentes, analisando as capturas escolhidas de acordo com o local onde mais células puderam ser visualizadas em um corte transversal (Matsubara et al. 2000; Huet et al. 2015; Negrão et al. 2019). Foram utilizadas áreas seccionais médias obtidas para cada grupo como indicadores do tamanho da célula.

Para análise fractal foram analisadas secções histológicas, coradas com HE, de 10 animais/grupo, sendo fotografadas (3 campos histológicos/secção, aumento de 40x), binarizadas para leitura. Como ferramenta avaliativa o software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), pelo método box-counting. O software considerou o box-counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço dessa forma não considerando a textura da imagem. Com isso as duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma dimensão fractal, dessa forma as análises foram guiadas na relação entre a resolução e a escala avaliada, e o resultado fora quantitativamente expresso como a dimensão fractal do objeto que é  $DF = (\log Nr / \log r^{-1})$ , sendo Nr a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e r a escala aplicada ao objeto. Dessa forma, a dimensão fractal foi calculada com o software Image J ficando sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes. (Oliveira Junior et al. 2013; Huet et al. 2015).

### **Biomarcadores do estresse oxidativo Avaliação da Peroxidação lipídica**

A avaliação da lipoperoxidação (LPO) foi determinada por meio da análise do hidroperóxido de lipídio o qual evidencia uma das fases da oxidação de ácidos graxos (Aviram and Eias 1993; Parfitt et al. 1994). Para isso foi utilizado o ensaio de reatividade ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), comparando com a curva padrão do sub-produto da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA). Para tal, 50uL de cada amostra foi pipetada em duplicata em microplaca de 96 poços, seguido da adição de FeCl<sub>3</sub> (1M), agitado e incubado em banho a 90°C por 15 minutos. Em seguida a placa foi resfriada para interromper a reação, e então foi avaliada em leitor de placas, nos comprimentos de onda de 535 e 572nm. A peroxidação lipídica foi estimada por quantidade total de proteína, e os resultados expressos em nmol de TBARS por mg de proteína.

### **Atividade de Glutathione-S-transferase**

A atividade da Glutathione-S-transferase (GST) foi avaliada por espectrofotometria com CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) de acordo com Keen et al. (1976), com base na respectiva conjugação com a glutathione reduzida (GSH) (Keen et al. 1976). Foi feito o monitoramento do aumento da absorvância, através da formação do tioeter no comprimento de onda de 340nm (RS: 100 mM potassium phosphate buffer pH 6.5; 1.5 mM GSH; 2 mM CDNB) por 5 minutos com 40 segundos de intervalo. Valores foram expressos em uM de tioeter formado/min/mg proteína.

### **Atividade de Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade de Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada seguindo o ensaio descrito por Ewing e Janero (1995), através da redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH e fenazina metassulfato em pH fisiológico mensurada a 560nm (Ewing and Janero 1995). A mistura foi preparada contendo tampão de carbonato de sódio (50mM, pH 10,2), NTB (96 uM) e Triton X-100 (0,6%), incubada por 2 minutos com hidrocloreto de sódio e hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH·HCl) (20 mM, pH 6.0). O volume final foi ajustado para 200 uL. A reação consiste na quantificação de complexos formados por anions superóxido com adição de NBT e NH<sub>2</sub>OH·HCl, pela coloração amarelada dado a redução de NBT, resultando em uma coloração azulada lida em leitor de microplacas a 560 nm por 2

minutos com intervalos de 15 segundos. Os resultados foram expressos em U de SOD por mg de proteína.

### **Quantificação de Glutathiona reduzida (GSH)**

Os níveis de Glutathiona reduzida (GSH) foi avaliada de acordo com método descrito por Sedlak e Lindsay (1968) com adaptações de Siervo (2015). Os níveis de GSH foram determinados com DITIOBIS-5,5-(2-NITRO-ACIDO BENZOICO) em sobrenadante de homogenato de coração evidenciados pela formação de coloração amarela. Os níveis de GSH foram avaliados em 412 nm e os resultados expressos em micromol/mg de proteína (Sedlak and Lindsay 1968; Siervo et al. 2015).

### **Análise estatística**

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste t não paramétrico (dados normais) ou por meio do teste de Mann Whitney (dados não paramétricos). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, ou mediana e intervalo interquartil dependendo da distribuição Gausiana dos dados. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism7. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

### **Resultados Ecocardiograma**

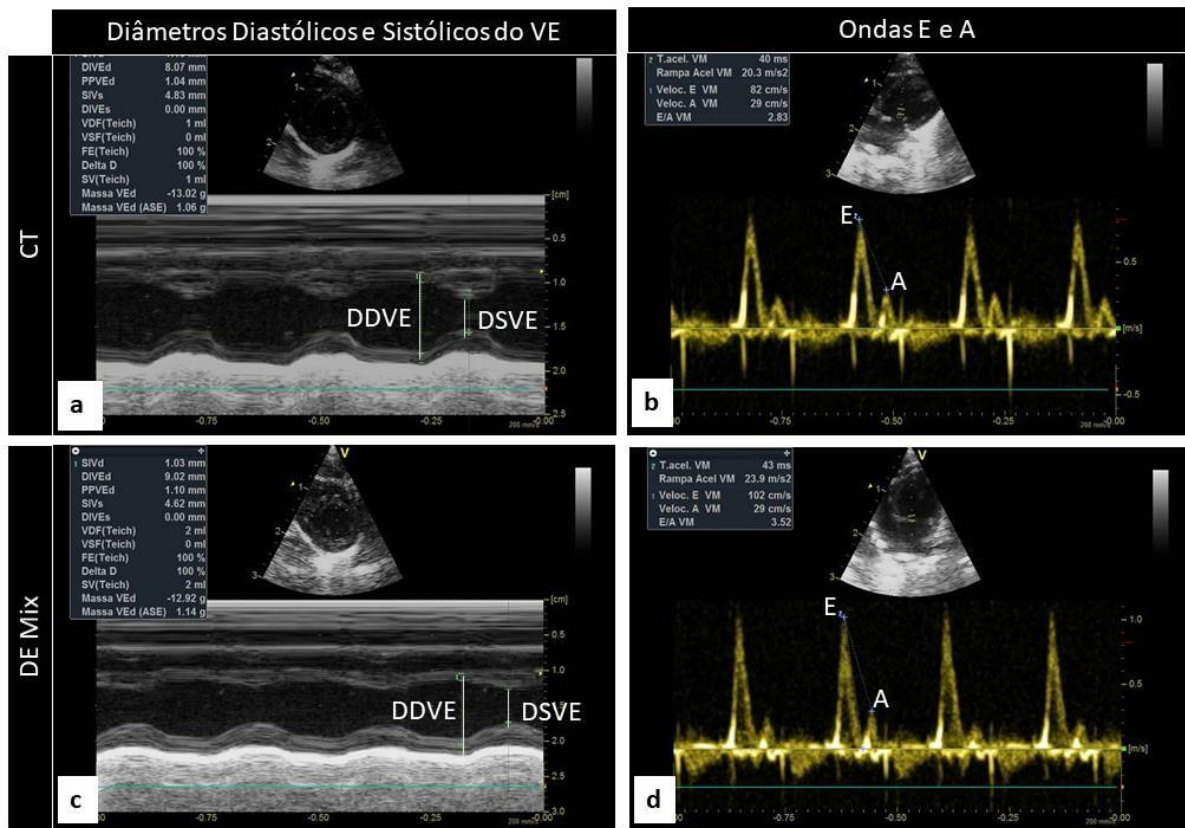
Em relação a análise ecocardiográfica, não houve alterações nos parâmetros estruturais avaliados pelo diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e massa do VE, bem como não houve alterações na função sistólica avaliada pela fração de encurtamento do endocárdio do ventrículo esquerdo e fração de ejeção. A função diastólica (onda E/onda A e TRIV) foi semelhante entre os grupos experimentais. (Tabela 2 e Figura 2).



**Tabela 2.** Dados estruturais e funcionais ecocardiográficos. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e intervalo interquartilico.

Variáveis	Grupos Experimentais		p valor
	CT (n= 11)	DE Mix (n=10)	
FC (bpm)	212.3 $\pm$ 18.09	224.2 $\pm$ 22.30	0.19
DDVE (mm)	8.80 $\pm$ 0.43	8.69 $\pm$ 0.51	0.61
DSVE (mm)	4.88 $\pm$ 0.32	4.88 $\pm$ 0.32	0.99
EDPP (mm)	1.24 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.09	0.07
% ENC END	44.44 $\pm$ 3.12	44.70 $\pm$ 3.32	0.85
Massa VE (g)	0.37 (0.29-0.39)	0.28 (0.26-0.36)	0.06
E/A	3.37 $\pm$ 1.15	3.68 $\pm$ 1.20	0.55
FE %	0.82 $\pm$ 0.02	0.82 $\pm$ 0.02	0.89
TRIV (ms)	41.36 $\pm$ 4.53	42.90 $\pm$ 5.59	0.49

FC: frequência cardíaca; DDVE e DSVE; Diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE), respectivamente; EDPP espessura da parede posterior; % ENC END: porcentagem de encurtamento do endocárdio; massa do VE; E/A: onda E/onda A; FE: fração de ejeção; TRIV: tempo de relaxamento isivolumétrico do VE. Teste t ou Mann Whitney.



**Figura 2.** Figuras ilustrativas da análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo: (a) diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico do VE (DSVE) do Grupo CT, (b) medidas das ondas E e A no Grupo CT, (c) diâmetro diastólico e sistólico do VE do Grupo DE Mix, (d) medidas das ondas E e A no Grupo DE Mix.

### Dados anômicos

Quanto ao peso dos animais, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais. Contudo, a mistura de DE causou redução no VD no Grupo DE Mix. Em relação aos índices de hipertrofia representados pelas relações VE/PCF, AT/PCF e VD/PCF, nenhum apresentou resultados significativos entre os grupos. (Tabela 3)

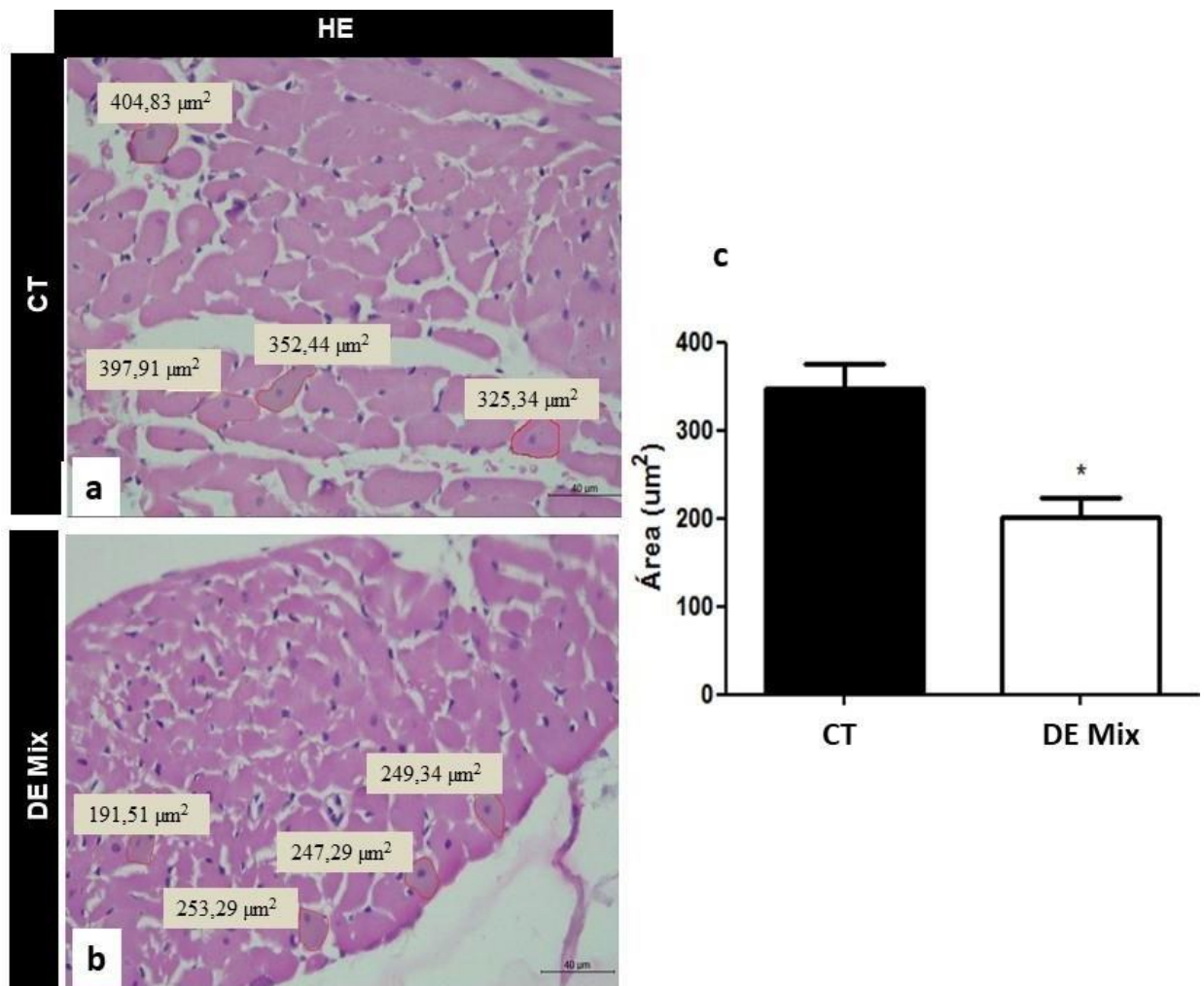
**Tabela 3.** Dados anatômicos dos ratos submetidos a exposição crônica de DE.

Variáveis	Grupos Experimentais		p valor
	CT (n= 11)	DE Mix (n= 10)	
PCF (g)	503,2 ± 16,50	500,5 ± 16,51	0,91
AT (g)	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,67
AT/PCF (mg/g)	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,72
VD (g)	0,28 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,045
VD/PCF (mg/g)	0,54 ± 0,07	0,48 ± 0,05	0,37
VE (g)	1,01 ± 0,02	0,98 ± 0,03	0,46
VE/PCF (mg/g)	2,03 ± 0,04	1,97 ± 0,02	0,25

PCF: peso corporal final, AT: átrio, AT/PCF: relação átrio e peso corporal final, VD: ventrículo direito, VD/PCF: relação ventrículo direito e peso corporal final, VE: ventrículo esquerdo, VE/PCF: relação ventrículo esquerdo e peso corporal final.

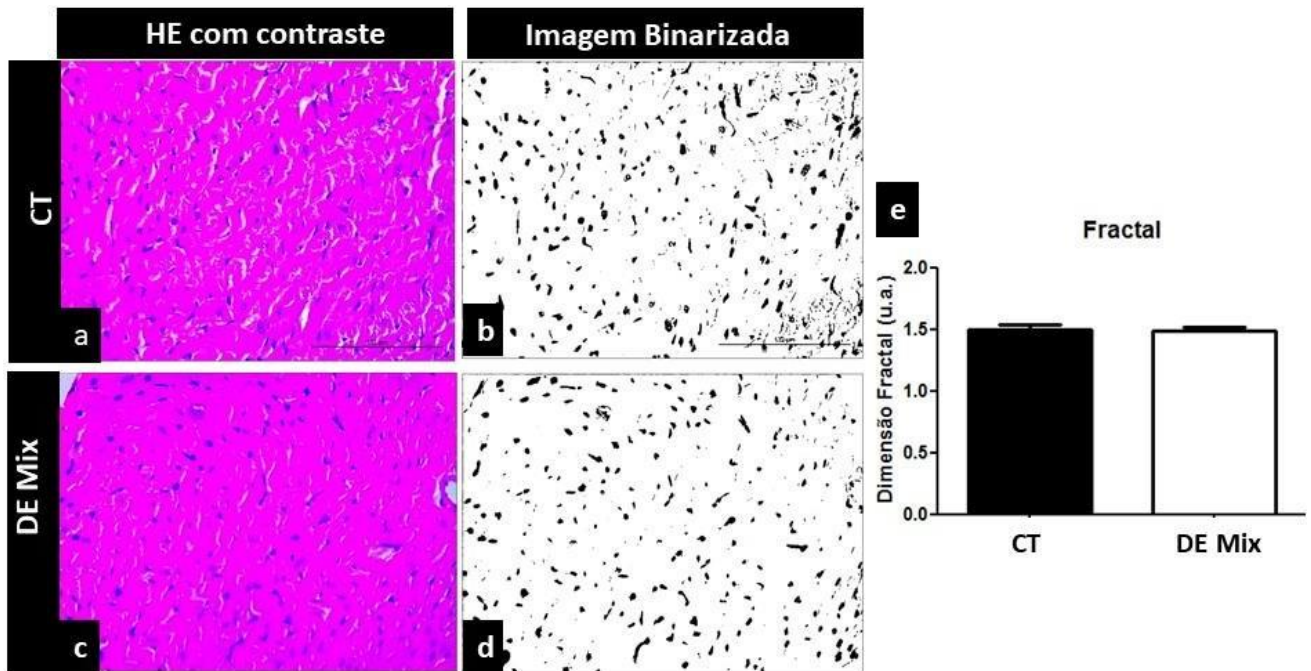
### **Análise histológica**

Essa análise evidenciou, uma diminuição de 41,78% da área dos cardiomiócitos dos ratos tratados com a mistura de DE em relação ao grupo controle (Grupo CT-  $347 \pm 91,62 \mu\text{m}^2$  e Grupo DE Mix-  $202 \pm 72,70 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,01$ ). (Figura 3)



**Figura 3.** Análise histopatológica do tecido cardíaco do Grupo CT (a) e Grupo DE Mix (b) coradas com Hematoxilina e Eosina. Aumento de 400X. Teste t não pareado. \*  $p < 0,05$ .

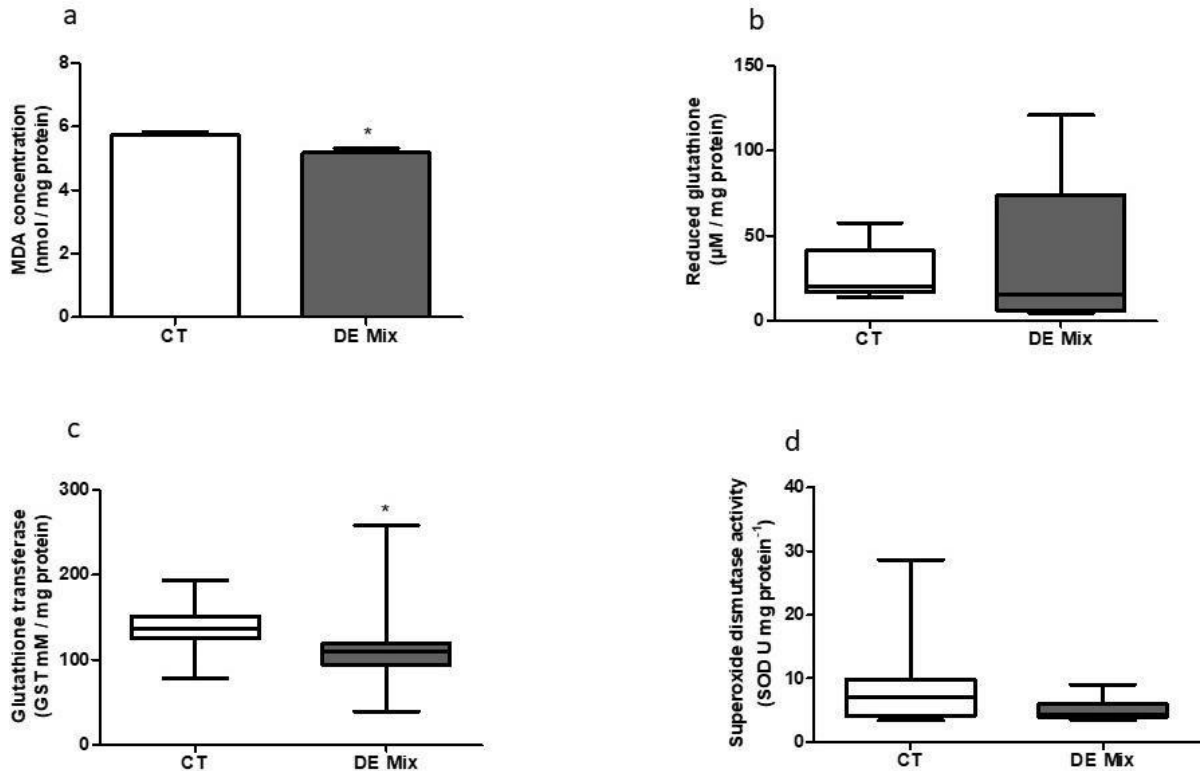
Para avaliar a organização tecidual cardíaca, foi avaliada a dimensão fractal utilizando cortes histológicos do ventrículo esquerdo corados com HE. Não houve alteração da dimensão fractal entre os grupos avaliados (Grupo CT- $1.5 \pm 0.10$  ua vs. Grupo DE Mix-  $1.40 \pm 0.9$  ua). (Figura 4)



**Figura 4.** Cortes histológicos de ventrículo esquerdo do Grupo CT e de animais submetidos a exposição de mistura de DE- Grupo DE Mix, corados com HE (a e c). Sendo que (b e d) correspondem as imagens em HE após processo de binarização, onde é possível observar que o núcleo aparece em preto, enquanto o resto da célula em branco. O Grupo DE Mix não apresentou mudanças na fractabilidade (e). Teste t não pareado.

#### Biomarcadores do estresse oxidativo

Os resultados de MDA (malondialdeído) ou TBARS, mostram uma diminuição nos níveis de MDA no Grupo DE Mix quando comparado com o CT (CT-  $5,73 \pm 0,36$  vs. DE Mix-  $5,17 \pm 0,60$  nmol/mg de proteína,  $p = 0,008$ ) (Fig. 5a). Dentre os parâmetros do sistema antioxidante do organismo não houve diferença estatística para SOD (CT-  $10,18 \pm 9,25$  vs. DE Mix-  $4,93 \pm 1,48$  U por mg de proteína,  $p = 0,10$ ) e GSH (CT-  $28,47 \pm 15,17$  vs. DE Mix-  $39,66 \pm 43,85$   $\mu$ M por mg de proteína,  $p = 0,53$ ) (Fig. 5d e 5b). Contudo, houve diminuição da atividade de GST (CT-  $138,3 \pm 28,44$  vs. DE Mix-  $113,8 \pm 48,44$  mM por mg de proteína,  $p = 0,01$ ) no grupo submetido ao tratamento com DE. (Fig. 5c).



**Figura 5.** Quantificação de estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. (a) Comparação dos níveis de malondialdeído entre os Grupos CT e DE Mix, como indicativo de estresse oxidativo (peroxidação lipídica). (b) Níveis de GSH entre os grupos. (c) Quantificação da atividade enzimática de GST e (d) SOD entre os grupos. Teste t não pareado ou Mann Whitney. \*  $p < 0.05$  vs. CT.

## Discussão

Para o nosso conhecimento esse é o primeiro estudo que aborda o impacto provocado por uma mistura de DE no microambiente cardíaco em ratos expostos desde a vida intra uterina até a vida adulta, de forma a mimetizar a exposição humana. Esse estudo evidenciou alteração da remodelação cardíaca, ocasionando cardiomiopatia com atrofia dos cardiomiócitos e modificações nos biomarcadores do estresse oxidativo. Mesmo sem alterar as funções sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo avaliadas pelo ecocardiograma, essas modificações a nível celular mostram os efeitos cardiotoxícos dessa mistura de DE.

O desenvolvimento intrauterino é altamente vulnerável a perturbações ambientais (Beydoun & Saftlas 2008) e certas agressões durante este período pode levar a alterações cardíacas permanentes (Johnson et al. 2003; Linglart L and Bonnet D, 2022; Maduro et al., 2022). Altas

doses pre natais de DE foi associada a condições adversas de saúde, incluindo alterações neurológicas, musculares, reprodutivas e do sistema imune (Yin et al., 2021 ; Liu et al., 2022; Høyer et al., 2018). A exposição de embriões de zebrafish a DEHP e dibutyl phthalate (DBP) mostrou correlação com alta incidência de defeitos cardíacos como edema pericárdico e anormalidades nos batimentos (Tang et al., 2018).

No presente estudo, embora tenha sido encontrada alterações celulares não houve piora funcional e estrutural quando avaliada pelo ecocardiograma. O contrário do apresentado por outros estudos, como o conduzido por Hu et al. (2016) e Wu et al. (2021), em que exposição de 30 e 150 dias (respectivamente) a bisfenol A nas doses de 30 à 100mg/kg/dia, levou a alterações nos parâmetros ecocardiográficos de ratos, diminuindo a fração de ejeção consideravelmente quando comparados com o grupo controle (Hu et al. 2016; Wu et al. 2021). Essa discordância, pode ser em decorrência de possíveis efeitos sinérgicos entre as substâncias misturadas, ou mesmo da dose utilizada, no estudo de Hu et al. (2016) os animais foram tratados com Bisfenol A nas doses de 5, 20, 100 mg/Kg e as alterações foram observadas na dose de 100 mg/Kg, já no estudo conduzido por Wu et al. (2021), a dose utilizada foi de 30 mg/kg/dia.

A diminuição significativa da área de cardiomiócitos induzida pela mistura de DE no tecido cardíaco do VE, indica atrofia cardíaca, caracterizada pela modificação morfológica do tecido cardíaco e que pode desencadear alterações funcionais tardias. Diversos estudos demonstram os efeitos de DE causando disfunções cardiovasculares e alteração estruturais dos cardiomiócitos (Posnack et al. 2011; Negrão et al. 2019; R et al. 2019; Ramadan et al. 2020; Zhang et al. 2022). Em estudo conduzido por Posnack e colaboradores (2010), mostrou que cardiomiócitos de camundongos neonatais cultivados *in vitro*, expostos a DEHP, tiveram níveis de mRNA alterados para genes de endotelina e metaloproteinases (2 e 9), e na expressão de genes como da proteína vimentina que constitui filamentos de intermediários de fibroblastos, responsáveis pela estruturação do tecido (Posnack et al., 2010). Além disso, outros DE como o Bisfenol são conhecidos por induzir a hipertrofia de cardiomiócitos. Embora os mecanismos associados a indução de hipertrofia não tenham sido elucidados, os níveis de estresse oxidativo nos cardiomiócitos permaneceram alterados (Ramadan et al. 2020). Nosso estudo é o primeiro a mostrar que a exposição crônica a esses DE podem afetar estruturalmente o micro ambiente cardíaco, causando atrofia dos cardiomiócitos. A atrofia cardíaca, com degradação proteica também pode estar relacionada com o sistema ubiquitina-proteasomal (UPS) e com a via lisossomal autofágica (ALP) ( Zhu et al. 2007; Willis et al. 2009; Lodka et al. 2016). Um outro mecanismo que pode ter ocasionado atrofia dos cardiomiócitos é a ação das espécies reativas



de oxigênio presentes no tecido. Os grupos carbonilas de proteínas (GCP) são as principais ocorrências de oxidação proteicas que são geralmente associadas a produção de ERO. O surgimento excessivo de GCP pode causar danos severos aos cardiomiócitos, causando disfunção ou alterações morfológicas. (Ben Amara et al. 2011; Hamdi et al. 2022). Esse menor tamanho dos cardiomiócitos também pode estar relacionado a alterações do crescimento fetal que se associa ao aumento do risco de doenças cardiometabólicas (Sánchez-Soriano C, et al., 2022).

Em relação a dimensão fractal, empregamos essa metodologia inovadora, simples e de baixo custo com o objetivo analisar a organização celular com uma melhor acurácia e independente de avaliador. A dimensão fractal foi utilizada para melhor caracterizar as alterações fenotípicas cardíacas da hipertensão pulmonar, se mostrou uma ferramenta promissora para o reconhecimento de alterações cardíacas pós transplante e foi utilizada para diferenciar hipertrofia cardíaca fisiológica que ocorrem em atletas da cardiomiopatia (Moreira et al., 2011; Pacagnelli et al., 2016; Vilades et al., 2021). No nosso estudo não houve alterações da regularidade nuclear, assim como no estudo de De Oliveira Mantovani et al. 2021 em que os animais ingeriram ração com o herbicida 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) por 6 meses. Isso evidencia que, apesar da atrofia observada nos cardiomiócitos, ainda não houve tempo suficiente para alterações do núcleo celular.

Embora ensaios de embriotoxicidade cardíaca sejam escassos em roedores, estudos com outros modelos experimentais, podem servir de base para novas perspectivas de ensaios, analisando o impacto desses desreguladores ainda durante a embriogênese. Chapalamadugu et al., 2014, afim de avaliar o impacto de um desses desreguladores, o Bisphenol A, no desenvolvimento cardíaco, trataram macacas prenhes com doses altas de bisphenol A. Em seguida analisando o transcriptoma e expressão genica de genes associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares em corações fetais, foi possível observar que houve uma regulação negativa de genes como cadeia pesada de miosina e isoforma cardíaca alfa (Myh6) e regulação positiva de disintegrina e metaloproteinasas 12 em ambos os ventrículos e no atrio direito (Chapalamadugu et al. 2014). A alteração induzida pelo BPA desses genes suporta a hipótese de que a exposição ao BPA durante o desenvolvimento fetal pode afetar o coração. No nosso estudo, as alterações nos corações dos ratos tratados desde a vida intrauterina com o mix de DE, pode ter iniciado durante a embriogênese.

Um outro estudo conduzido por Weng et al., 2021, mostrou que a exposição crônica a epoxiconazol, em embriões de zebrafish em diferentes concentrações promoveu alterações nos batimentos cardíacos, além de más formações, sendo assim um indicativo de cardiotoxicidade (Weng et al., 2021).



O estresse oxidativo está associado ao surgimento de diversos quadros patológicos, incluindo doenças cardiovasculares (Baradaran et al. 2014; Samman Tahhan et al. 2017; Guarnier et al. 2019) pois a manutenção do equilíbrio entre a produção de ERO e os elementos antioxidantes são fundamentais para a adequada estruturação e funcionalidade cardíaca. (Izzo et al. 2021). Nós demonstramos que uma mistura de DE desde a vida intrauterina até a vida adulta promoveu alteração do estresse oxidativo com diminuição da LPO no coração. Em resposta a essas alterações a GST também diminuiu. Essa diminuição da LPO pode estar relacionada a um efeito crônico para promover detoxificação cardíaca com ação do sistema antioxidante estabelecendo um processo adaptativo de proteção ao coração contra as ações tóxicas crônicas da mistura dos DE. O estudo conduzido por Scarton et al., (2022) fez essa relação, onde ratas Wistar adultas com 67 dias de idade, foram expostas ao DE (ciantraniliprole – inseticida sintético) nas doses de 10 ou 150 mg/kg/dia via oral por 28 dias, conduziu a uma diminuição significativa de LPO em órgãos reprodutivos, mediante a um aumento de GST (da Silva Scarton et al. 2022). Embora nosso estudo tenha sido conduzido em tecido cardíaco, essa relação é muito bem descrita na literatura nesse tecido, estabelecendo uma função clara da GST mediante produção de ERO, uma vez que esta quando conjugada com GSH tem a capacidade de detoxificação de lipídios oxidados por ERO (Pérez-Torres et al. 2022).

O estudo conduzido por Hamdi et al., (2022), mostrou que a exposição de diferentes concentrações de DE por 28 dias, induziu uma maior expressão de enzimas antioxidantes como a CAT e SOD e aumento da LPO (Hamdi et al. 2022). A diferença entre nossos resultados pode estar relacionada aos diferentes períodos de exposição. Como no nosso estudo os biomarcadores de estresse oxidativo foram mensurados nos animais apenas no tempo final de 220 dias, existe a possibilidade de que o sistema antioxidante enzimático representado pela enzima GST esteja sendo consumida e induzindo a redução da LPO. Estudos como o de Hamdi et al (2022) e Chaâbane et al (2016), que utilizaram DE apresentaram níveis de MDA elevados após tratamento de 28 e 15 dias respectivamente, e níveis de enzimas antioxidantes como SOD e CAT elevados. Entretanto, o aumento da dose induziu diminuição dessa enzima como provável combate ao estresse oxidativo. (Chaâbane et al. 2016; Hamdi et al. 2022). Fatores como dose e tempo de exposição podem repercutir de forma diferente na resposta protetiva tecidual contra o estresse oxidativo.

Muitos dos estudos que abordam os efeitos dos DE no sistema cardiovascular, utilizam apenas uma ou duas dessas substâncias, o presente estudo buscou avaliar os possíveis impactos em uma mistura desses DE, se assemelhando a uma exposição mais cotidiana. Além disso,

muitos estudos abordam análises de efeitos agudos, em altas concentrações dos compostos isolados, enquanto que o presente trabalho, busca uma análise de exposição crônica. Esses achados são importantes no âmbito da saúde pública uma vez que demonstram a cardiotoxicidade de produtos nos quais somos expostos e é uma pesquisa básica translacional na qual pode direcionar a realização de outros estudos em humanos. Para autoridades sanitárias e regulamentadoras promove a reflexão de para estudos que busquem novas alternativas para substituir esses DE na produção de materiais presentes no cotidiano, tal qual materiais de intervenções hospitalares, para redução da exposição e conseqüentemente prevenção dos possíveis efeitos tóxicos.

### **Conclusão**

A mistura de DE de forma crônica, desde a gestação até a fase adulta, teve impacto negativo no microambiente cardíaco, promovendo atrofia cardíaca e alterações nos marcadores do estresse oxidativo, sem promover alterações funcionais.

### **Agradecimento**

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo-2018/24044-0), cujo responsável foi o Dr. Leonardo de Oliveira Mendes.

## REFERÊNCIAS

- Amara I, Timoumi R, Annabi E, et al (2019) Di (2-ethylhexyl) phthalate induces cardiac disorders in BALB/c mice. *Environ Sci Pollut Res Int* 26:7540–7549. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04219-w>
- Aviram M, Eias K (1993) Dietary olive oil reduces low-density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. *Ann Nutr Metab* 37:75–84. <https://doi.org/10.1159/000177753>
- Axelstad M, Christiansen S, Boberg J, et al (2014) Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reprod Camb Engl* 147:489–501. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0447>
- Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M (2014) Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci* 19:358–367.
- Beydoun, H., & Saftlas, A. F. (2008). Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: A review of recent evidence. *Pediatric and Perinatal Epidemiology.*, 22, 438–466. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2008.00951.x>
- Ben Amara I, Soudani N, Troudi A, et al (2011) Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:811–819. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.007>
- Boberg J, Johansson HKL, Hadrup N, et al (2015) Perinatal exposure to mixtures of anti-androgenic chemicals causes proliferative lesions in rat prostate. *The Prostate* 75:126–140. <https://doi.org/10.1002/pros.22897>
- Chaâbane M, Tir M, Hamdi S, et al (2016) Improvement of Heart Redox States Contributes to the Beneficial Effects of Selenium Against Penconazole-Induced Cardiotoxicity in Adult Rats. *Biol Trace Elem Res* 169:261–270. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0426-0>
- Chapalamadugu KC, VandeVoort CA, Settles ML, et al (2014) Maternal Bisphenol A Exposure Impacts the Fetal Heart Transcriptome. *PLoS One* 9:e89096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089096>
- Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, et al (2012) Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J Androl* 35:303–316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01242.x>
- Cohn Jay N, Ferrari R, Sharpe N, null null (2000) Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on

- cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 35:569–582.  
[https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(99\)00630-0](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00630-0)
- Silva Scarton SR, Tsuzuki F, Guerra MT, et al (2022) Cyantraniliprole impairs reproductive parameters by inducing oxidative stress in adult female wistar rats. *Reprod Toxicol Elmsford N* 107:166–174.  
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.12.009>
- De Oliveira Mantovani R, Pinheiro DG, et al (2021) Effect of different doses of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on cardiac parameters in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 28:3078–3087.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-10699-y>
- Deng T, Xie X, Duan J, et al. (2019) Di-(2-ethylhexyl) phthalate induced an increase in blood pressure via activation of ACE and inhibition of the bradykinin-NO pathway. *Environ Pollut Barking Essex* 1987 247:927–934.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.099>
- Ewing JF, Janero DR (1995) Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem* 232:243–248.  
<https://doi.org/10.1006/abio.1995.0014>
- Fielitz J, Kim M-S, Shelton JM, et al (2007a) Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest* 117:2486–2495. <https://doi.org/10.1172/JCI32827>
- Fielitz J, van Rooij E, Spencer JA, et al (2007b) Loss of muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4377–4382.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0611726104>
- Guarnier LP, Romão PVM, Palozi RAC, et al (2019) Development of a Predictive Model to Induce Atherogenesis and Hepato-Renal Impairment in Female Rats. *Biomolecules* 9:664. <https://doi.org/10.3390/biom9110664>
- Hamdi H, Ben othmene Y, Khelifi A, et al (2022) Subchronic exposure to Epoxiconazole induced-heart damage in male Wistar rats. *Pestic Biochem Physiol* 182:105034. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105034>
- Høyer BB, Lenters, V, Giwercman A, et al. (2018). Impact of Di-2-ethylhexyl phthalate metabolites on male reproductive function: a systematic review of human evidence. *Curr. Environ. Health Rep.* 5, 20–33.
- Hu Y, Zhang L, Wu X, et al (2016) Bisphenol A, an environmental estrogen-like toxic chemical, induces cardiac fibrosis by activating the ERK1/2 pathway. *Toxicol Lett* 250–251:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.03.008>
- Huet E, Gabison E, Vallee B, et al (2015) Deletion of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 induces altered cardiac extracellular matrix remodeling in aging mice. *J Physiol Pharmacol off J Pol Physiol*

Soc 66:355–366

- Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, et al (2014) Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disruptors. *Reprod Camb Engl* 147:465– 476. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0448>
- Izzo C, Vitillo P, Di Pietro P, et al (2021) The Role of Oxidative Stress in Cardiovascular Aging and Cardiovascular Diseases. *Life* 11:60. <https://doi.org/10.3390/life11010060>
- Johnson PD, Goldberg SJ, Mays, MZ, et al. (2003). Threshold of trichloroethylene contamination in maternal drinking waters affecting fetal heart development in the rat. *Environ Health Perspect* 111:289–292.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, et al (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4:715–740. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s4715>
- Keen JH, Habig WH, Jakoby WB.(1976) Mechanism for the several activities of the glutathione S- transferases. *J Biol Chem* 251:6183–6188
- Léa Linglart, DB (2022) Epigenetics and Congenital Heart Diseases. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2022 Jun 9;9(6):185. doi: 10.3390/jcdd9060185.
- Liu X, Zhang Y, Sun X, et al. Di-(2-ethyl hexyl) phthalate induced oxidative stress promotes microplastics mediated apoptosis and necroptosis in mice skeletal muscle by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway. *Toxicology.* 2022 May 30;474:153226. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153226>.
- Lodka D, Pahuja A, Geers-Knörr C, et al (2016) Muscle RING-finger 2 and 3 maintain striated-muscle structure and function. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 7:165–180. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12057>
- Maduro C, Castro LF, Moleiro ML, et al. Pregestational Diabetes and Congenital Heart Defects. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2022 Oct;44(10):953-961. doi: 10.1055/s-0042-1755458.
- Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, et al (2000) Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H1534-1539. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.4.H1534>
- Moreira RD, Moriel AR, Murta Junior LO, et al. (2011) Fractal dimension in quantifying the degree of myocardial cellular rejection after cardiac transplantation. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 26(2): 155– 163. <https://doi.org/10.1590/S0102-76382011000200004>
- Mouton AJ, El Hajj EC, Ninh VK, et al (2020) Inflammatory cardiac fibroblast phenotype underlies chronic alcohol-induced cardiac atrophy and

- dysfunction. *Life Sci* 245:117330. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117330>
- Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, et al (2007) The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 13:619–624. <https://doi.org/10.1038/nm1574>
- Negrão ALR, Oliveira B, Gonçalves MG, et al (2019) Effect of Short-Term Inhalation of The Herbicide 2,4D on Cardiac Remodeling: Morphological Aspects. *Int J Cardiovasc Sci* 32:247– 252. <https://doi.org/10.5935/2359-4802.20190014>
- Okoshi K, Ribeiro HB, Okoshi MP, et al (2004) Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J* 45:647–656. <https://doi.org/10.1536/jhj.45.647>
- Oliveira Junior SA, Padovani CR, Rodrigues SA, et al (2013) Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. *Cardiovasc Diabetol* 12:65. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-65>
- Pacagnelli FL, Sabela AKDA, Mariano TB et al (2016) Fractal dimension in quantifying experimental- pulmonary hypertension-induced cardiac dysfunction in rats. *Arq Bras Cardiol* 107(1):33–39. <https://doi.org/10.5935/abc.20160083>
- Parfitt VJ, Desomeaux K, Bolton CH, et al. (1994) Effects of high monounsaturated and polyunsaturated fat diets on plasma lipoproteins and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*
- Pérez-Torres I, Manzano-Pech L, Guarner-Lans V, et al (2022) Deodorized Garlic Decreases Oxidative Stress Caused by Lipopolysaccharide in Rat Heart through Hydrogen Sulfide: Preliminary Findings. *Int J Mol Sci* 23:12529. <https://doi.org/10.3390/ijms232012529>
- Petrakis D, Vassilopoulou L, Mamoulakis C. et al (2017) Endocrine Disruptors Leading to Obesity and Related Diseases. *Int J Environ Res Public Health* 14:. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101282>
- Posnack NG, Lee NH, Brown R, et al. (2011) Gene expression profiling of DEHP-treated cardiomyocytes reveals potential causes of phthalate arrhythmogenicity. *Toxicology* 279:54– 64. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.09.007>
- Jaimes, R., McCullough, D., Siegel, B., et al (2019). Plasticizer Interaction With the Heart: Chemicals Used in Plastic Medical Devices Can Interfere With Cardiac Electrophysiology. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, 12(7), e007294. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.119.007294>

- Ramadan, M., Cooper, B., Posnack, N.G., (2020) Bisphenols and phthalates: Plastic chemical exposures can contribute to adverse cardiovascular health outcomes. *Birth Defects Res* 112:1362–1385.  
<https://doi.org/10.1002/bdr2.1752>
- Samman TA, Sandesara PB, Hayek, S.S. et al (2017) Association between oxidative stress and atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 14:1849–1855.  
<https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.07.028>
- Sánchez-Soriano C, Pearson ER, M Reynolds RM (2022). The role of genetics in fetal programming of adult cardiometabolic disease. *J Dev Orig Health Dis* 13(3):292-299. doi: 10.1017/S2040174421000350.
- Sedlak J, Lindsay RH. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Siervo GEML, Vieira HR, Ogo FM. et al (2015) Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology* 330:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.01.016>
- Soto AM, Sonnenschein C. (2010) Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat Rev Endocrinol* 6:363–370.  
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.87>
- Tang C, Deng Y, Duan H, Zhang Y, Li Y, et al. (2018). The effect of maternal exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate on fetal cardiac development in mice. *J. Appl. Toxicol.* 38, 834–842.
- Vilades D, Garcia-Moll X, Gomez-Llorente M, et al. (2021) Differentiation of athlete's heart and hypertrophic cardiomyopathy by the fractal dimension of left ventricular trabeculae. *Int J Cardiol* 1;330:232-237. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.02.042>.
- Wang Y, Jin C, Wang D., et al (2021) Effects of chlorothalonil, prochloraz and the combination on intestinal barrier function and glucolipid metabolism in the liver of mice. *J Hazard Mater* 410:124639.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124639>
- Wang Y, Wen Y, Xiao P, et al (2020) Di-n-butyl phthalate promotes lipid accumulation via the miR200c-5p-ABCA1 pathway in THP-1 macrophages. *Environ Pollut* 264:114723.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114723>
- Weng Y, Huang Z, Wu A, et al (2021) Embryonic toxicity of epoxiconazole exposure to the early life stage of zebrafish. *Science of The Total Environment* 778:146407.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146407>

- Willis MS, Schisler, JC, Li L, et al (2009) Cardiac muscle ring finger-1 increases susceptibility to heart failure in vivo. *Circ Res* 105:80–88.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.194928>
- Wu B, Zhao Q, Li Z, et al (2021) Environmental level bisphenol A accelerates alterations of the reno- cardiac axis by the MAPK cascades in male diabetic rats: An analysis based on transcriptomic profiling and bioinformatics. *Environ Pollut* 287:117671. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117671>
- Yin X, Zeb R, Wei H, Cai L, (2021). Acute exposure of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) induces immune signal regulation and ferroptosis in oryzias melastigma. *Chemosphere* 265, 129053.
- Zhang H, Zhao Y, Cui J-G., et al (2022) DEHP-induced mitophagy and mitochondrial damage in the heart are associated with dysregulated mitochondrial biogenesis. *Food Chem Toxicol* 161:112818.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112818>
- Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, et al (2007) Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J Clin Invest* 117:1782–1793.  
<https://doi.org/10.1172/JCI27523>



## ANEXO A - Aprovação Ética

---

### UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

---

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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

## Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DE UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS BASEADA NA EXPOSIÇÃO HUMANA SOBRE O MICROAMBIENTE CARDÍACO", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 7036 e tendo como participante(s) ALESSANDRA GOMES DUARTE RODRIGUES (discente), MATHEUS SANTOS OLIVEIRA (discente), AMANDA SCHADEK BETINI MORETTI (discente), CATHARINA YUKI TAYAMA (discente), KARINE ALVES RIBEIRO (discente), GLAURA SCANTAMBURLO ALVES FERNANDES (participante externo/voluntário), LEONARDO DE OLIVEIRA MENDES (docente), FRANCIS LOPES PACAGNELLI (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 08/09/2021.

#### MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
6034	11/03/2020	UNOESTE	SIM	Laboratório de genética- Unoeste

Presidente Prudente, 7 de Dezembro de 2021.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Docente Responsável pela CPDI

Prof. Dr. Felipe Rydygier de Ruediger  
Coordenador da CEUA - UNOESTE

## **ANEXO B - Normas da Revista Environmental Science and Pollution Research**

### **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” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### **Source Files**

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

### **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)

### **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

#### Article by DOI

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

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* 341:325–329

- Book

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

- Book chapter

Online document

Brown B, Aaron M (2001) *The politics of nature*. In: Smith J (ed) *The rise of modern 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

*"The authors declare that no funds, grants, or other support were received"*

- 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 Xikuanoshan antimony mine. *Acta Scientiae Circumstantiae* 29:655-661 (in 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."*

*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.