



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

RAÍSSA DE OLIVEIRA MANTOVANI

**EFEITOS DE DIFERENTES DOSES DO 2,4 ÁCIDO DICLOROFENOCIACÉTICO
(2,4-D) NOS PARAMETROS CARDÍACOS EM RATOS MACHOS WISTAR**

Presidente Prudente - SP
2019



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

RAÍSSA DE OLIVEIRA MANTOVANI

**EFEITOS DE DIFERENTES DOSES DO 2,4 ÁCIDO DICLOROFENOCIACÉTICO
(2,4-D) NOS PARAMETROS CARDÍACOS EM RATOS MACHOS 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: Clínica Médica

Orientadora: Prof. Dra. Francis Lopes Pacagnelli

636.089
M293a

Mantovani, Raíssa de Oliveira.

Efeito de diferentes doses do 2,4 ácido diclorofenociacético (2,4-D) nos parâmetros cardíacos em ratos machos Wistar / Raíssa de Oliveira Mantovani – Presidente Prudente, 2019.

41 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientadora: Francis Lopes Pacagnelli

1. 2,4-Diclorofenociacético. 2. Herbicida. 3. Cardiotoxicidade. 4. Apoptose. 1. Título.

RAÍSSA DE OLIVEIRA MANTOVANI

**EFEITOS DE DIFERENTES DOSES DO 2,4 ÁCIDO DICLOROFENOCIACÉTICO
(2,4-D) NOS PARAMETROS CARDÍACOS EM RATOS MACHOS 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 em Ciência Animal - Área de Concentração: Clínica médica.

Presidente Prudente, 02 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Francis Lopes Pacagnelli
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dra. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dra. Giovana Rampazzo Teixeira
Faculdade de Ciências e Tecnologia - Unesp
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Maria Rita Gonçalves de Oliveira Mantovani e Sidnei Sandro Mantovani, aos meus avôs ausentes Alice Gonçalves da Cruz Oliveira e Leonardo da Cruz Oliveira, que se dedicaram ao máximo para que eu conquistasse todos meus sonhos até agora.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, Nossa Senhora por ter me abençoado e guiado durante toda minha trajetória.

Aos meus pais Maria Rita Gonçalves de Oliveira Mantovani, Sidnei Sandro Mantovani e irmão Jordano de Oliveira Mantovani, por todo apoio, amor, dedicação e paciência. Sempre me dando forças para seguir em frente e conquistar mais uma etapa na vida.

Aos meus avôs ausentes Alice Gonçalves da Cruz Oliveira e Leonardo da Cruz Oliveira que sempre estiveram ao meu lado me dando amor, carinho, incentivo aos estudos, me apoiaram sempre em minhas decisões, sei que estarão presentes comigo sempre.

Aos meus tios Marco Antônio, Márcia, Leonardo Júnior, Carlos Alberto, pelo incentivo desde pequena e apoio.

A minha orientadora Prof.^a. Dra. Francis Lopes Pacagnelli, minha segunda mãezona, primeiramente obrigada por ter me aceitado como sua orientanda, não sei nem como agradecer tudo o que fez por mim durante esses dois anos de convivência. Você é uma pessoa iluminada, que eu nunca imaginava encontrar para desenvolver algo tão importante em minha trajetória profissional e que fez esse terror chamado “MESTRADO” que muitos dizem, ser leve e de muito aprendizado. Esteve ao meu lado nos piores e melhores momentos, me estimulou a nunca desistir, chorou e sorriu comigo e ouviu meus desabaços, sempre me acalmando e dizendo “Você é muito abençoada”. Obrigada por tudo.

A Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai por ter compartilhado seu projeto conosco e disponibilizado seu laboratório para parte do experimento.

Gostaria de agradecer também a Prof.^a. Dra. Giovana Rampazzo Teixeira, por ter disponibilizado seu tempo e seu laboratório LEBioEX para desenvolvimento das minhas análises e também as alunas e agora amigas Allice Santos Cruz Veras e Maria Eduarda De Almeida Tavares, que não pouparam esforços desde o começo do experimento, me ajudaram com tudo, ensinando detalhadamente cada passo do procedimento, com muita paciência e dedicação.

As alunas Dyovana Gomes Pinheiro, Geovana Letícia Fernandes De Oliveira, Stéfani Nobrega Perrud, por terem me ajudado durante os procedimentos e análises.

Agradeço a todos os docentes do Mestrado em Ciência Animal, as funcionárias Joyce Andrade, Keid Ribeiro Kruger e aos funcionários do Biotério, Graziela e Lucas que me acompanharam em todo meu experimento.

Obrigada a todos!

"Acima de tudo, não tenha medo de momentos difíceis. O melhor vem deles"

- Rita Levi-Montalcini

RESUMO

Efeito de diferentes doses do 2,4 ácido diclorofenociacético (2,4-D) nos parâmetros cardíacos em ratos machos Wistar

Introdução: O ácido 2,4-diclorofenociacético (2,4-D) teve um crescimento de consumo desde 2001 sendo considerado o herbicida mais empregado no mercado residencial e sétimo herbicida mais utilizado no mercado agrícola. Avaliar a cardiotoxicidade provocada pelo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), é de extrema relevância uma vez que esse herbicida é muito utilizado nas lavouras de arroz, café, açúcar dentre outros alimentos que são de consumo mundial e pode acarretar importantes prejuízos funcionais. **Objetivo:** Avaliar o efeito do consumo de ração nebulizada com diferentes doses do herbicida 2,4-D no coração de ratos Wistar. **Metodologia:** Trinta ratos Wistar albinos machos (200 - 300g) três meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais: GC – grupo controle (n=10): receberam ração nebulizada com água destilada, GBC – grupo de baixa concentração (n=10): receberam ração nebulizada com pesticida com $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), GAC – grupo de alta concentração (n=10): receberam ração nebulizada com pesticida com $9,28 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha). As rações foram nebulizadas durante 15 minutos, todas as segundas-feiras e quintas-feiras e disponibilizadas aos ratos todas as terças e sextas-feiras. As duas concentrações de herbicida foram diluídas em 10 ml de solução salina a 0,9%. A coleta das amostras de sangue foi por meio de punção intracardíaca, e após a eutanásia, o coração de cada animal foi retirado para avaliar alterações histológicas, análise imuno-histoquímica para avaliação inflamatória e vias apoptóticas e dimensão fractal. **Resultados:** O principal achado é que o uso da ração nebulizada com o herbicida 2,4-D em altas concentrações a longo prazo promoveu em ratos cardiotoxicidade evidenciada pelo aumento da imunomarcagem para BAX, Bcl-2 e relação BAX/Bcl-2 e também do NF- κ B citoplasmático e nuclear no ventrículo esquerdo, sem ocasionar alteração histológica cardíaca e da dimensão fractal. **Conclusão:** O uso oral da ração nebulizada pelo herbicida 2,4-D a longo prazo promoveu cardiotoxicidade no grupo que receberam maior dose do herbicida.

Palavras-chave: 2,4-Diclorofenociacético, herbicida, cardiotoxicidade, apoptose.

ABSTRACT

Effect of different doses of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on cardiac parameters in male Wistar rats

Introduction: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) has grown in consumption since 2001, being considered the most widely used herbicide in the residential market and the most widely used herbicide in the agricultural market. Considering a cardiotoxicity caused by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is of utmost importance since this herbicide is widely used in rice, coffee, sugar crops and other foods that are of global consumption and can cause significant damage. functional impairments. **Objective:** To evaluate the effect of nebulized feed intake with different doses of 2,4-D herbicide on the heart of Wistar rats. **Methodology:** Thirty three month old male albino Wistar rats (200 - 300g) were randomly assigned to 3 experimental groups: CG - control group (n = 10): received distilled water nebulized ration, GBC - low concentration group (n = 10): received pesticide nebulized feed with 3.71×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (gia / ha), GAC - high concentration group (n = 10): received 9.28×10^{-3} grams of active ingredient per hectare (gia / ha). The rations were nebulized for 15 minutes every Monday and Thursday and made available to rats every Tuesday and Friday. The two herbicide concentrations were diluted in 10 ml of 0.9% saline. Blood samples were collected by intracardiac puncture, and after euthanasia, the heart of each animal was removed to evaluate histological changes, immunohistochemical analysis for inflammatory evaluation and apoptotic pathways and fractal dimension. **Results:** The main finding is that the use of nebulized diet with the herbicide 2,4-D in high long term concentrations promoted in cardiotoxicity evidenced by the increase of immunostaining for BAX, Bcl-2 and BAX / Bcl-2 ratio and also cytoplasmic and nuclear NF-kB in the left ventricle, without causing cardiac histological alteration and fractal dimension. **Conclusion:** Long-term oral use of the nebulized diet with the 2,4-D herbicide promoted cardiotoxicity in the group that received the highest dose of herbicide.

Key words: 2,4-Dichlorophenoxyacetic, herbicide, cardiotoxicity, apoptosis.

LISTA DE SIGLAS

2,4-D	– Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
EPI	– Equipamentos de proteção individual
HE	– Hematoxilina - Eosina
GC	– Grupo Controle
GBC	– Grupo Baixa Concentração
GAC	– Grupo Alta Concentração
CK-MB	– Creatina quinase fração músculo-cérebro
g.i.a/ha	– Gramas de ingrediente ativo por hectare
TNF- α	– Fator de necrose tumoral alfa
NF-kB	– Fator nuclear kappa B
Bcl-2	– B-cell CLL/lymphoma2
BAX	– Bcl2-associated X protein
IkkB	– Inibidor do fator nuclear kappa B-beta subunidade quinase
USEPA	– Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
VE	– Ventrículo Esquerdo
VD	– Ventrículo Direito
PCF	– Peso corporal final

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	12
	ANEXO 1 – APROVAÇÃO ÉTICA.....	26
	ANEXO 2 – NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	27

ARTIGO ORIGINAL**Efeito de diferentes doses do 2,4 ácido diclorofenociacético (2,4-D) nos parâmetros cardíacos em ratos machos Wistar**

Raíssa De Oliveira Mantovani¹, Dyovana Gomes Pinheiro², Geovana Letícia Fernandes De Oliveira², Stéfani Nobrega Perrud², Giovana Rampazzo Teixeira³, Gisele Alborghetti Nai¹, Allice Santos Cruz Veras³, Maria Eduarda De Almeida Tavares³, Leonardo de Oliveira Mendes¹, Francis Lopes Pacagnelli^{1,2}.

¹ Programa Pós-Graduação em Ciência Animal, UNOESTE - Presidente Prudente - Brasil

² Faculdade de Ciências da Saúde, Curso de Fisioterapia, UNOESTE - Presidente Prudente – Brasil

³ Faculdade de Ciências e Tecnologia – Unesp - Presidente Prudente - Brasil

Correspondência: Francis Lopes Pacagnelli, Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Rodovia Raposo Tavares, km572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente - SP - Brasil. CEP:19.067-175. Telefone:(18)3229-2000

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do consumo de ração nebulizada com diferentes doses do herbicida 2,4- diclorofenoxiacético no coração de ratos. Foram utilizados trinta ratos Wistar machos (200-300g) três meses de idade. A ração foi exposta ao 2,4-D em duas diferentes doses (GC: Grupo Controle 10ml de água destilada; GBC: Grupo Baixa Concentração $3,71 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha diluídas em 10 ml de solução salina a 0,9% e GAC: Grupo Alta Concentração $9,28 \times 10^{-3}$ g.i.a/ha diluídas em 10 ml de solução salina a 0,9%). Após seis meses de exposição, foram coletadas amostras de sangue para avaliação da creatina quinase fração músculo-cérebro (CK-MB), e fragmentos do ventrículo esquerdo foram analisados por avaliação histológica, dimensão fractal e imuno-histoquímica (Bax, Bcl2, TNF- α e NF-kB). Não houve alterações significativas na concentração de CK-MB, parâmetros histológicos, dimensão fractal. O uso oral da ração nebulizada pelo herbicida 2,4-D a longo prazo promoveu cardiotoxicidade no grupo que receberam maior dose do herbicida.

Palavras Chaves: 2,4-Diclorofenoxiacético, herbicida, cardiotoxicidade, apoptose.

INTRODUÇÃO

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos herbicidas mais utilizados mundialmente no mercado agrícola, apresentou um crescimento de consumo desde 2001, sendo considerado o mais empregado no mercado residencial e sétimo mais utilizado no mercado agrícola. (Marouani et al. 2016). Registrado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) 2005 este pode ser aplicado para combater a destruição de ervas daninhas de folhas largas nas lavouras de culturas de arroz, cana-de-açúcar, milho, pastagem, soja, trigo, campos de frutas e hortaliças.

Pessoas que trabalham manipulando os herbicidas possuem elevado risco de contaminação por seus resíduos seja pelo contato com a pele, inalação ou mesmo ingestão. A longo prazo a exposição sem o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) podem ocasionar danos à saúde assim como o consumo desses alimentos. (USEPA, 2005).

A exposição a agrodefensivos em geral, causam uma série de efeitos tóxicos, tanto em animais quanto em seres humanos, como a carcinogênese (Alavanja et al. 2013), cardiotoxicidade, imunotoxicidade (Razavi et al. 2013), desregulação hormonal, toxicidade renal (Grewal et al. 2010), problemas respiratórios (Bener et al. 1999), estresse oxidativo (Vadhana et al. 2010).

A avaliação da toxicidade cardíaca já foi demonstrada com uso de outros agrodefensivos, tais como fosfina, dimetoato, permetrina e organofosforado (Abdolghaffari et al. 2015; Amara et al. 2013; Solgi et al. 2015; Razavi et al. 2015; Vadhana et al. 2013; Vadhana et al. 2010). Os efeitos cardiotoxícos descritos foram redução da pressão arterial e frequência cardíaca, isquemia (Abdolghaffari et al. 2015; Solgi et al. 2015), apoptose, necrose, disfunção mitocondrial, fibrose e inflamação (Amara et al. 2013; Razavi et al. 2015; Vadhana et al. 2013; Vadhana et al. 2010). Houve também aumento da creatina quinase fração músculo-cérebro (CK-MB) e do estresse oxidativo (Vadhana et al. 2010; Razavi et al. 2015). Alguns estudos desses agrodefensivos promoveram hipotrofia e outros relatam hipertrofia dos cardiomiócitos (Vadhana et al. 2013; Razavi et al. 2015).

Entretanto, só temos conhecimento de um estudo que avaliou o impacto do uso do 2,4-D no sistema cardiovascular. Nesse estudo foi realizada administração crônica (seis semanas) e observou-se a elevação da pressão arterial e o aumento da sensibilidade a arritmia. (Janicki et al. 1986).

Avaliar a cardiotoxicidade provocada pelo 2,4-D, é de extrema relevância uma vez que esse herbicida é muito utilizado nas lavouras de arroz, café, cana-de-açúcar dentre outros alimentos que são de consumo mundial e pode acarretar importantes prejuízos funcionais cardíacos para direcionar estratégias terapêuticas cardioprotetoras. Por esse motivo, no presente estudo, avaliou o efeito do consumo de ração nebulizada com diferentes doses do herbicida 2,4- diclorofenoxiacético no coração de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos de natureza ética

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil, pelo protocolo de número 4396. E também se apresenta em conformidade com os princípios de cuidados com animais de laboratório formulado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Animais

Trinta ratos Wistar albinos machos (200 - 300g) três meses de idade, foram fornecidos pelo Biotério Central da UNOESTE e alojados no Biotério Experimental da mesma Universidade. Foram alocados em gaiolas

plásticas (30cm x 16cm x 19cm), a uma temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclos de 12 horas de luminosidade (07:00 as 19:00 horas, período claro e 19:00 as 07:00 horas período escuro). A água filtrada foi *ad libitum* e ração comercial (Supralab®, Alisu, Brazil).

Os ratos foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais (n= 10 animais por grupo): GC – grupo controle (n=10): receberam ração nebulizada com água destilada; GBC – grupo de baixa concentração (n=10): receberam ração nebulizada com pesticida com $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha); GAC – grupo de alta concentração (n=10): receberam ração nebulizada com pesticida com $9,28 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) (Mello et al. 2018)

As duas doses foram baseadas na recomendação do fabricante para o uso agrícola do 2,4-D (Nortox S.A., Arapongas, Paraná, Brasil) e adaptadas ao tamanho da câmara de exposição. Foram utilizadas duas câmaras (32x 24x 32 cm) conectadas ao nebulizador ultrassônico (Pulmosonic Star®) (Mello et al. 2018).

As rações foram nebulizadas durante 15 minutos, todas as segundas-feiras e quintas-feiras e disponibilizadas aos ratos todas as terças e sextas-feiras. As duas concentrações de herbicida foram diluídas em 10 ml de solução salina a 0,9%.

A ração dos animais de todos os grupos foi pesada a cada troca para a avaliação da quantidade de ingestão.

Todos os animais foram alimentados durante seis meses e após este período foram eutanasiados. A eutanásia foi realizada com Tiopental sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg de peso, respectivamente, administrado na cavidade peritoneal. Os indicadores de morte foram a ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos (Ministério da Saúde, 2005).

Análise bioquímica sérica

O sangue foi coletado por punção cardíaca para bioquímica sérica da creatina quinase fração músculo-cérebro (CK-MB) em tubos (Vacutainer®) sem anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm ($g = 1257$). O soro obtido foi acondicionado em microtubos plásticos e mantido a -20°C . A bioquímica sérica foi realizada por meio do método cinético UV automatizado (Cobas C111, Roche®) (Adriana et al. 2016)

Análise dos parâmetros anatômicos

Os animais foram eutanasiados e seus órgãos (coração) foram retirados e pesados individualmente. O peso úmido do ventrículo esquerdo (VE), do ventrículo direito (VD) e dos átrios foi normalizado pelo comprimento da tíbia, utilizado como índice de hipertrofia ventricular (Pinheiro et al. 2018)

Análise histológica

Amostras de tecido cardíaco foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 24h e feito a lavagem por um período de 48 horas. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina Paraplastic®, obtendo-se a seguir cortes histológicos coronais de 4 micrômetros.

Os cortes histológicos foram submetidos a coloração de Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição de áreas da secção transversa dos cardiomiócitos, empregando-se microscópio LEICA DMLS (DM750, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), aumento de 400X, acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador dotado de programa de análise de imagens ImagePro-plus. De cada animal foram selecionados 15 campos histológicos dos quais foram selecionados cinquenta cardiomiócitos seccionados transversalmente, que apresentavam forma redonda, núcleo visível no centro da célula e localizavam-se na camada subendocárdica da parede muscular do VE. Esse cuidado visa uniformizar ao máximo o conjunto de cardiomiócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foi utilizada como indicador do tamanho celular

(Adriana et al. 2016). Foi realizada uma análise qualitativa para avaliar células em apoptose, necrose, fibrose e inflamação (Amara et al. 2013; Razavi et al. 2015; Vadhana et al. 2013; Vadhana et al. 2010).

Dimensão Fractal

Para dimensão fractal, foram fotografadas 7 imagens para cada animal com ampliação de 400x para a avaliação da regularidade nuclear.

A dimensão fractal foi estimada pelo método Boxcounting, com auxílio do software ImageJ[®] do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), amplamente utilizado na literatura e disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Esse software considera o Boxcounting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não considerando, portanto, a textura da imagem. A influência disso é que duas imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma dimensão fractal. Por este fato a dimensão fractal calculada com o ImageJ[®] ficará sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes (Pacagnelli et al. 2016)

Análise imunohistoquímica e quantificação da expressão de marcadores inflamatórios, índice apoptótico para coração.

Amostras do músculo cardíaco de 5 animais de cada grupo foram utilizadas para as imunomarcações. As secções foram submetidas à reação com os anticorpos primários específicos NF- κ B (sc-109, Santa Cruz Biotechnology), TNF- α (sc-1350, Santa Cruz Biotechnology), Bcl-2 (sc-492, Santa Cruz Biotechnology), BAX (sc-526, Santa Cruz Biotechnology). De acordo com as características de cada antígeno, a recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato em micro-ondas. Utilizamos o kit *Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K*, incubadas em câmara úmida overnight a 4°C em geladeira. Foi realizado o controle negativo das amostras para critério de comparação com os cortes incubados com anticorpos primários. Posteriormente, os cortes foram incubados com pós-primário, 30 minutos, seguido do bloqueio de polímero, 30 minutos e revelados com diaminobenzidina (DAB), contra corados com *Hematoxilina de Harris*. Dez imagens dos cinco ratos de cada grupo foram adquiridas utilizando o fotomicroscópio Zeiss Axiophoto (Zeiss, Munique, Alemanha) com ampliação de 400x. A imunorreatividade das proteínas foi quantificada através do software ImageJ[®] (versão 1.5), a fim de captar a expressão de cada proteína específica.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Para os dados que foram paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de Tukey, para os dados não paramétricos foi utilizado Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunns. Os dados foram expressos em médio \pm desvio padrão, mediana, mínimo e máximo. Foram utilizado o software GraphPad Prism. O nível de significância a ser considerado é de $p < 0,05$.

Resultados

Avaliação da quantidade da ingestão de ração nebulizada

Em relação ao consumo de ração nebulizada não houve diferença significativa entre os grupos. (Figura 1) ($p = 0,13$).

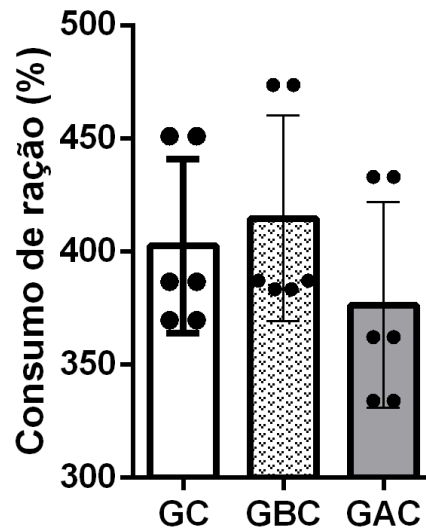


Figura 1 Consumo de ração nebulizada. Valores são expressos em média e desvio padrão. GC: Grupo Controle, GBC: Grupo Baixa Concentração e GAC: Grupo Alta Concentração. Teste Kruskal-Wallis seguido de Dunns

Avaliação bioquímica e dos parâmetros anatômicos

As análises foram realizadas com vinte e nove ratos, pois durante o experimento, um rato do grupo GAC teve que ser sacrificado por apresentar otite.

Em relação a dosagem da Creatina quinase músculo-cérebro (CK-MB) não houve aumento significativo desta enzima em relação aos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos para as variáveis anatômicas (Tabela 1).

Tabela 1 Parâmetro bioquímico e anatômicos dos ratos submetidos à exposição ao o herbicida 2,4-D.

VARIÁVEIS	GC (n=10)	GBC (n=10)	GAC (n=9)	p valor
CK-MB	526,6 (356,2-687,8)	479,3 (432,6-833,1)	388,3 (317,4-460,0)	0,19
PCF (g)	466,7 ± 26,72	490,1 ± 16,92	465,7 ± 26,10	0,05
VE (g)	1,05 ± 0,05	1,00 ± 0,06	1,02 ± 0,06	0,23
VE/Comp tibia (g/cm)	0,22 ± 0,017	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,015	0,43
VD (g)	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,59
VD/Comp tibia (g/cm)	0,04 ± 0,008	0,05 ± 0,007	0,05 ± 0,006	0,69
Átrios (g)	0,09 ± 0,017	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,47
Átrios/Comp tibia (g/cm)	0,01 ± 0,003	0,02 ± 0,007	0,02 ± 0,006	0,33

Dados como média ± DP. GC: Grupo controle, GBC: Grupo baixa concentração, GAC: Grupo alta concentração. PCF: peso corporal final. VE: Ventrículo Esquerdo. VE/comp tibia: relação ventrículo esquerdo com comprimento da tibia. VD: Ventrículo Direito. VD/comp tibia: relação ventrículo direito com comprimento da tibia. Átrios/comp tibia: relação dos átrios com o comprimento da tibia. CKMB: Creatina quinase músculo-cérebro. ANOVA seguido de Tukey ou Kruskal - Wallis seguido de Dunns.

Análise histológica cardíacas

Não houve presença de células inflamatórias, apoptose, necrose e fibrose. Houve uma tendência na diminuição dos cardiomiocitos nos grupos que foram expostos ao herbicida 2,4-D em relação ao grupo controle. (Figura 2) (p=0.12).

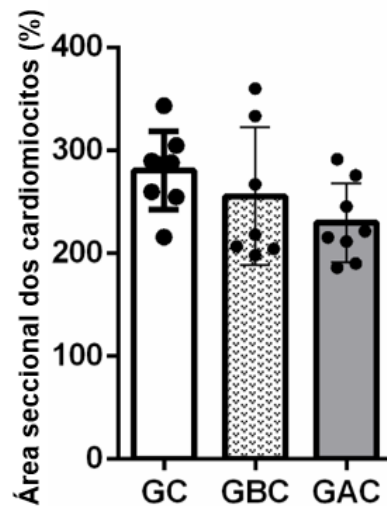


Figura 2 Análise histomorfométrica. Valores são expressos em média e desvio padrão. GC: Grupo Controle, GBC: Grupo Baixa Concentração e GAC: Grupo Alta Concentração. Teste Kruskal-Wallis seguido de Dunns.

Dimensão Fractal

Não houve alterações na dimensão fractal entre os grupos avaliados. (Figura 3)

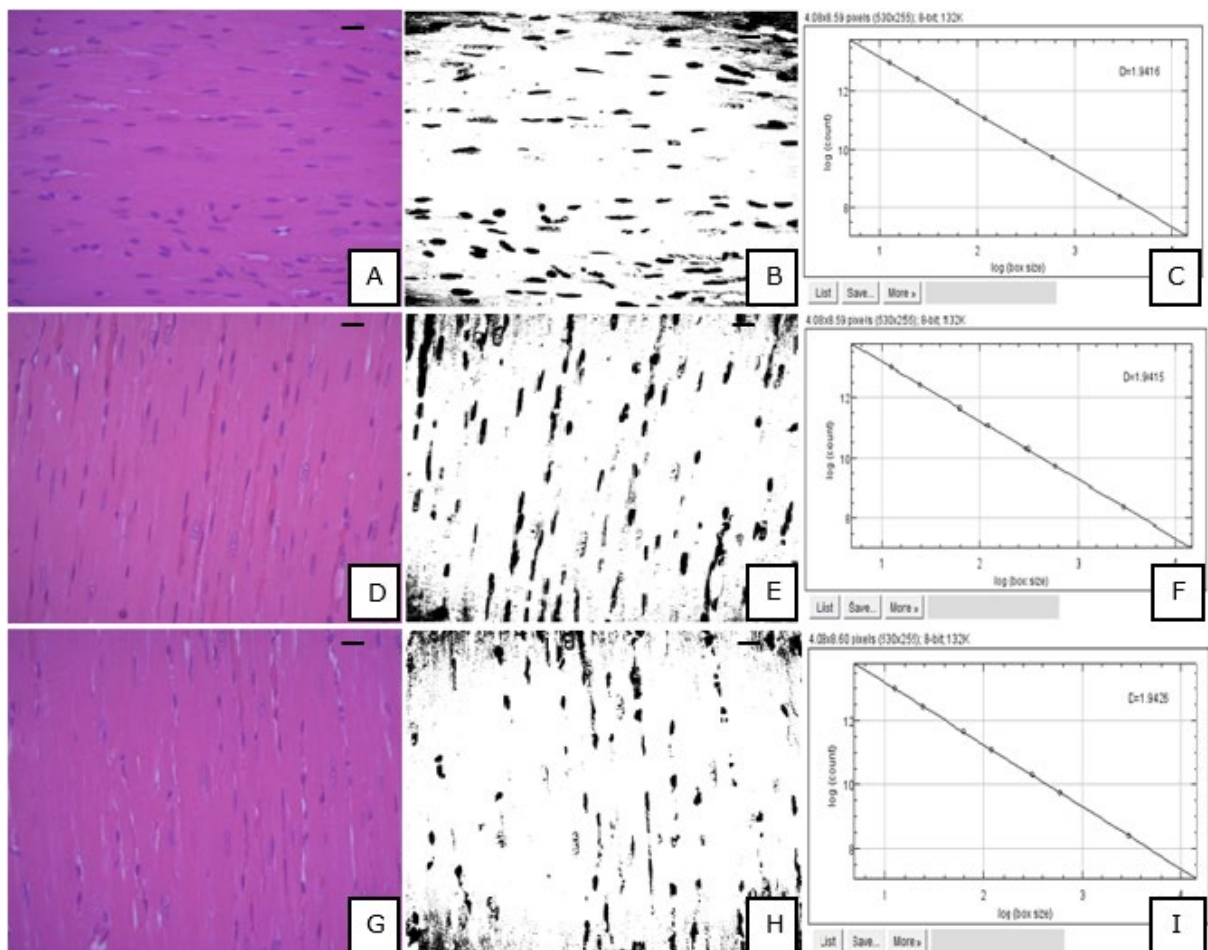


Figura 3 Dimensão Fractal. (A. GC, D. GBC e G. GAC) cortes histológicos dos ventrículos esquerdo corados em Hematoxilina e Eosina (HE), aumento 400x. B. GC, E. GBC e H. GAC são imagens de HE após o processo de binarização. Observam-se os núcleos celulares em preto e todo o restante da célula (citoplasma, membrana plasmática e outros elementos), em branco. (C. GC, F. GBC e I. GAC) regressão linear pela sobreposição de quadrados (N) de lados (r) progressivamente menores, sendo Nr a quantidade de quadrados de lado r necessários

para cobrir a imagem, a cada tamanho escolhido. A dimensão fractal é a inclinação da linha de regressão dos valores dos dois log.

Análise imunohistoquímica para avaliação de marcadores inflamatórios e apoptóticos

Houve aumento significativo da imunoposição BAX, entre os GC vs GAC e GBC vs GAC. Em relação a imunoposição Bcl-2, observou aumento significativo entre GBC vs GAC. (Figura 4)

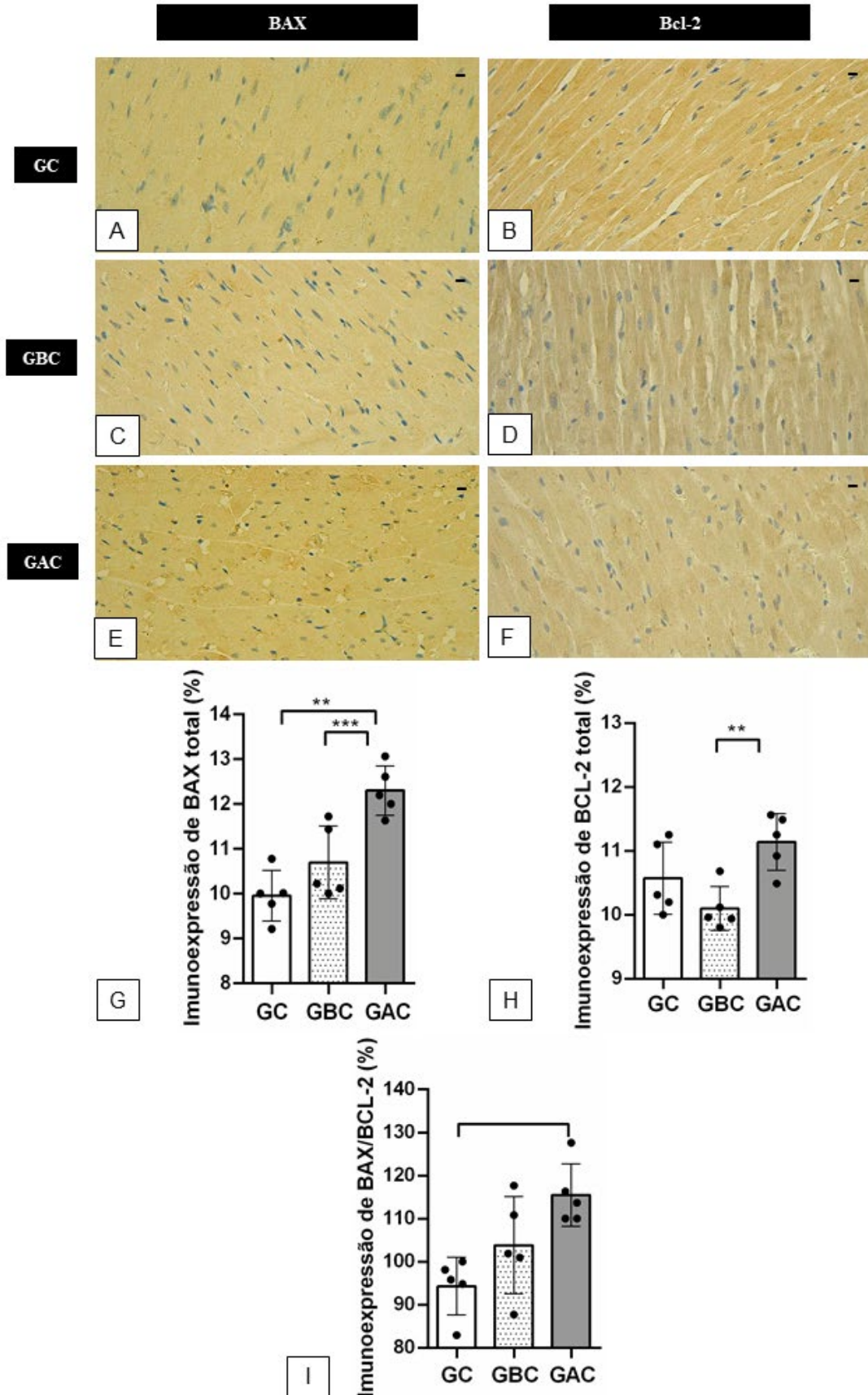
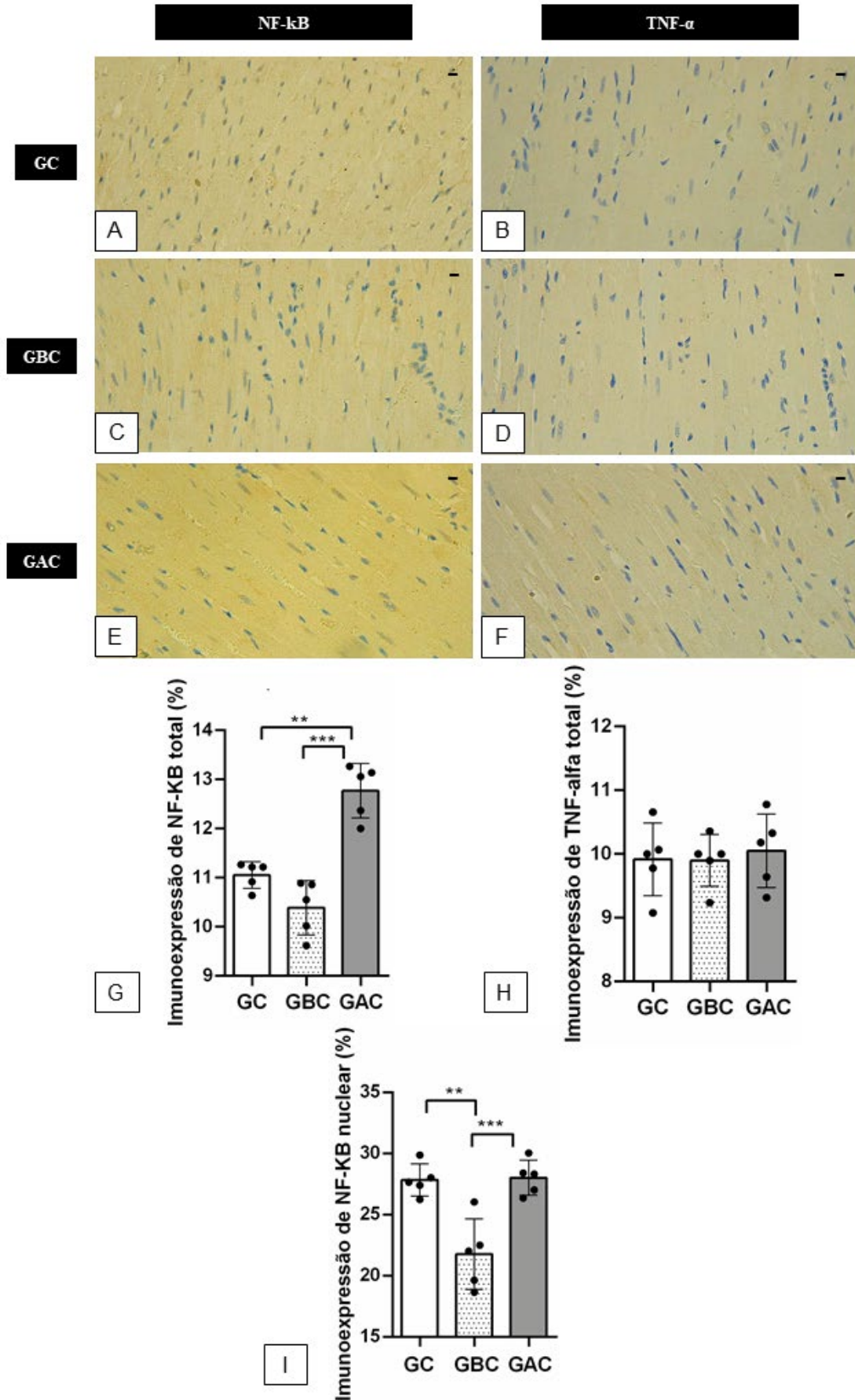


Figura 4 A, C, E e G. Imunoexpressão total de BAX nos três grupos, aumento de 400x. B, D, F e H. Imunoexpressão total de Bcl-2 nos três grupos aumento de 400x. GC: Grupo Controle, GBC: Grupo Baixa Concentração e GAC: Grupo de Alta Concentração. I imunoexpressão total da relação BAX/Bcl-2.

Houve aumento significativo da expressão NF-kB, entre os GC vs GAC e GBC em relação ao GAC. Em relação a imunoexpressão NF-kB nuclear onde houve significância de entre os GC vs GBC e GBC vs GAC.

Figura 5 A, C, E e G. Imunoexpressão total de NF-kB nos três grupos, aumento de 400x. B, D, F e H.



Imunoexpressão total de TNF- α nos três grupos, aumento de 400x. GC: Grupo Controle, GBC: Grupo Baixa Concentração e GAC: Grupo de Alta Concentração. I imunoexpressão total de NF-kB.

DISCUSSÃO

Objetivo deste estudo foi demonstrar a cardiotoxicidade do 2,4-D. O principal achado é que o uso da ração nebulizada com o herbicida 2,4-D em altas concentrações a longo prazo promoveu em ratos cardiotoxicidade evidenciada pelo aumento da imunomarcção para Bcl-2, BAX e BAX/Bcl-2 e também do NF-kB tanto citoplasmático quanto a nível nuclear no ventrículo esquerdo, sem ocasionar alteração histológica cardíaca e da dimensão fractal. Esses achados apontam para alterações apoptóticas celulares no ventrículo esquerdo e que podem evoluir para disfunções e insuficiência cardíaca.

No nosso estudo houve um aumento da imunomarcção da proteína pró-apoptótica BAX tanto em baixa como altas concentrações do herbicida 2,4-D. O aumento do BAX em altas concentrações pode estar relacionado com o aumento das espécies reativas de oxigênio como já demonstrado no estudo de Zhang et al. (2016). Esses autores testaram em camundongos via gavagem doses diferentes do herbicida 2,4-D para investigar toxicidade testicular e os possíveis mecanismos de ação. Exposição as doses máximas (100–200 mg/Kg/dia) por quatorze dias pode induzir ao comprometimento da função endócrina, estresse oxidativo excessivo e aumento da apoptose. Além disso, regulou positivamente a expressão da proteína p53 e BAX e diminuiu a expressão da proteína Bcl-2 no testículo. Demonstrando assim que a toxicidade testicular induzida por altas concentrações de 2,4-D em camundongos pode levar ao estresse oxidativo e a apoptose com comprometimento funcional importante. (Zhang et al. 2016).

As principais proteínas relacionadas a apoptose são B-cell CLL/lymphoma2 (Bcl-2) com propriedade antiapoptóticas e Bcl-2-associated X protein (BAX) com propriedade pró-apoptótica (Frenzel et al. 2009; Scorrano et al. 2003). Zhang et al. (2004) especifica que o homodímero de BAX acelera a apoptose, e o heterodímero que contém propriedade anti-apoptótica dos polipeptídeos BAX e Bcl-2, ajuda no aumento do BAX, resultando uma regulação positiva e de uma regulação negativa de Bcl-2 podendo induzir a apoptose. As caspases em especial a 3, atuam conjuntamente ao BAX/Bcl-2 para que possam controlar e ter melhor desempenho, reforçando seu papel fundamental na apoptose. No nosso estudo houve uma resposta protetora cardíaca com aumento do Bcl-2, mas mesmo assim a relação aumentada entre Bcl-2 anti-apoptótico e BAX pró-apoptótico é um indicador disfuncional como já foi avaliado em tecido lesionado (Asmarinah et al., 2014). A relação BAX/Bcl-2 aumentada pressupõem que as vias para apoptose estejam ativadas podendo assim posteriormente acarretar no comprometimento da função cardíaca.

Outra proteína reguladora de inflamação e apoptose o NF-kB é um dos principais fatores transcricionais reguladores dos genes envolvidos em resposta pro-inflamatória, associado ao remodelamento cardíaco adverso e apoptose e pode ser modificado por vários estímulos e nesse estudo observamos a influência do 2,4D em promover sua ativação (Vadhana et al. 2013; Gordon et al. 2011; Rivera-Serrano e Sherry, 2017). Em nosso estudo evidenciamos diminuição da imunomarcção do NF-kB no grupo baixa concentração e aumento da marcação no de alta concentração tanto no citoplasma quanto no núcleo celular. A ativação desse fator depende do tipo, da magnitude e duração do estímulo (Dhingra et al. 2010; Goren et al. 2004). Em baixas concentração a diminuição dessa ativação pode estar relacionada com resposta cardioprotetora para inibir essa via.

O Fator de transcrição NF-kB está presente no citoplasma das células e ligados nas proteínas inibitórias (IkkB), a ativação do NF-kB só acontece quando as proteínas inibitórias são fosforiladas, o NF-kB quando liberado migra do citoplasma para o núcleo, atuando na transcrição de genes (Kaltschmidt et al. 2006). O aumento no grupo alta concentração do NF-kB ocorreu com aumento da BAX/Bcl-2 o que demonstra sua possível influência no processo apoptótico celular do herbicida 2,4D atuando a nível citoplasmático quanto

nuclear possivelmente influenciando na transcrição gênica e na posterior biomarcação do BAX. Essas alterações podem predispor o cardiomiócito a uma piora funcional. O estresse oxidativo pode acarretar a apoptose induzida, onde NF-kB também tem um papel importante. Na insuficiência cardíaca, o NF-kB deu início a expressão de genes pró-apoptóticos, incluindo BAX e Fas, que passaram a induzir apoptose de células do miocárdio e endotelial, mostrando assim seu papel fundamental na ativação de pró apoptótica e nas alterações funcionais cardíacas. (Wu et al. 2014)

Estudos recentes demonstram, que em uma lesão aguda por hipóxia e reperfusão o NF-kB comporta-se como cardioprotetor. Entretanto, deve-se ressaltar, que em uma ativação prolongada do mesmo pode ser prejudicial, promovendo evolução para insuficiência cardíaca, e por desencadear inflamação crônica oriunda da liberação de citocinas. Tal exposição inclui a ativação de fatores de Necrose Tumoral α (TNF- α), Interleucina-1 e Interleucina-6, levando a respostas ao estresse do retículo endoplasmático e apoptose (Gordon et al. 2011). No nosso estudo não houve aumento da imunomarcagem para o TNF- α o que demonstra a possível ativação dessas outras citocinas.

O processo inflamatório foi observado com administração do diazinina em ratos em exposição subcrônica gerando cardiotoxicidade. De acordo com os autores, após administração via gavagem do herbicida Diazinina (DZN), foi evidenciado o aumento do BAX/Bcl-2 relacionado com infiltração de células inflamatórias, necrose multifocal no tecido cardíaco de ratos associadas a hemorragia e hipertrofia dos cardiomiócitos. (Razavi et al. 2013). Essas alterações podem desencadear prejuízos funcionais cardíacos como perda de contratilidade miocárdica ocasionando doenças como a insuficiência cardíaca.

No nosso estudo, houve uma tendência em diminuir a área dos cardiomiócitos, processo possivelmente relacionado a degradação proteica advinda da ativação das vias apoptóticas. (Vadhana et al. 2013) No estudo de Vadhana et al. (2013), que avaliou a exposição precoce à permetrina via gavagem, demonstrou que em baixas doses em longo prazo, levou a hipotrofia cardíaca, sem alterar o NF-kB, o que pode estar relacionado a outros mecanismos como menor ativação simpática.

Nosso estudo feito em ratos expostos ao 2,4-D não houve alterações na dimensão fractal o que demonstra regularidades nucleares celulares, sem alterações constatadas na avaliação histológica. Isso demonstra que as vias apoptóticas embora já tenham sido ativadas ainda não houve tempo hábil para manifestações histológicas que podem ser mais tardias ou ainda detectadas por técnicas mais específicas como o TUNEL (Kyrylkova et al. 2012).

Medidas de controle de segurança alimentar são extremamente importantes em ponto de vista da saúde pública em relação à fiscalização a quantidade de agrotóxicos utilizados em relação ao uso do 2,4-D uma vez que esse pode ocasionar prejuízos cardíacos.

Não avaliamos a funcionalidade cardíaca o que demonstra a necessidade de novos estudos com esse herbicida analisando as vias apoptóticas. Como pontos fortes do estudo vale destacar que a ração nebulizada simula a pulverização ambiental. A dose foi baseada na bula do herbicida 2,4-D, onde adaptamos os valores das concentrações conforme a área da caixa que foi realizada a nebulização da ração. Isso pode estar relacionado com as possíveis alterações cardíacas já que simula a ingestão do alimento nebulizado, mostrando o que realmente ocorre no dia a dia das pessoas, diferentes dos outros trabalhos que realizaram por ingestão via gavagem.

Conclusão

O uso oral da ração nebulizada pelo herbicida 2,4-D a longo prazo promoveu cardiotoxicidade no grupo que receberam maior dose do herbicida.

REFERÊNCIAS

- Abdolghaffari AH, Baghaei A, Solgi R et al (2015) Molecular and biochemical evidences on the protective effects of triiodothyronine against phosphine-induced cardiac and mitochondrial toxicity. *Life Sci.* 139:30-39. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.026>
- Adriana J, Cicogna AC, Engel LE et. al. (2016) Effects of Growth Hormone on Cardiac Remodeling During Resistance Training in Rats. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.106 no.1 São Paulo Jan. Epub Dec 08, 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20160003>
- Alavanja MC, Ross MK, Bonner MR. (2013) Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA Cancer J Clin.* 63(2):120-42. doi: 10.3322/caac.21170
- Amara IB, Soundani N, Hakim A. (2013) Protective effects of vitamin E and selenium against dimethoate-induced cardiotoxicity in vivo: biochemical and histological studies. *Environ Toxicol.* 28(11):630-43. doi: <https://doi.org/10.1002/tox.20759>
- Asmarinah, A., Paradowska-Dogan, A., Kodariah, R., Tanuhardja, B., Waliszewski, P., Mochtar, C. A., & Hinsch, E. (2014). Expression of the Bcl-2 family genes and complexes involved in the mitochondrial transport in prostate cancer cells. *International journal of oncology*, 45(4), 1489-1496.
- Bener, A. et al. (1999) Respiratory symptoms, skin disorders and serum IgE levels in farm workers. *Allergy Immunology*, v. 31, n. 2, p. 52-56.
- Dhingra R, Shaw JA, Aviv Y, Kirshenbaum LA. (2010) Dichotomous actions of NF-kappaB signaling pathways in heart. *J Cardiovasc Transl Res*; 3:344–354.
- Frenzel A, Grespi F, Chmielewskij W, Villunger A. (2009) Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptose*; 14 (4): 584-96. doi: 10.1007 / s10495-008-0300-zGordon et al. 2011;
- Goren N, Cuenca J, Martin-Sanz P, Bosca L. (2004) Attenuation of NF-kappaB signalling in rat cardiomyocytes at birth restricts the induction of inflammatory genes. *Cardiovasc Res.*; 64:289–297.
- Janicki PK, Paulo EA, Pasierbski W, Rutczyńska Z, Szreniawski Z. (1986) Interactions between herbicides and various of the most frequently used drug groups. I. Interactions between chronically administered herbicides: carbendazyme, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and drugs affecting the circulatory system. *Med Pr.*;37(3):167-74
- Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M. et al (2006). NF-κB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 26(8), 2936-2946.

Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). Detection of Apoptosis by TUNEL Assay. *Odontogenesis*, 41–47. doi:10.1007/978-1-61779-860-3_5

Marouani N, Tebourbi O, Cherif D et al (2016) Effects of oral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on reproductive parameters in male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 519–526. doi:10.1007/s11356-016-7656-3

Mello F, Quinallia G, Marion AC et al (2018) Evaluation of the nasal cavity of mice exposed to exposure to 2,4-chlorophenoxyacetic acid herbicide. *Medicine (Ribeirão Preto Online)* [Internet]. Dec. 27; 51 (4): 247-53.

Ministry of Health (2005) Laboratory Animal Handling Course. Gonçalo Muniz Research Center. http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf. Accessed March 25, 2018

Pacagnelli FL, Sabela, AKDA, Mariano TB et al. (2016) Fractal Dimension in Quantifying Experimental-PulmonaryHypertension-Induced Cardiac Dysfunction in Rats. *Arq Bras Cardiol*. 2016; 107(1):33-39. doi: 10.5935/abc.20160083

Pinheiro DG, Oliveira GLF, Perrud SN et al. (2018) Análise cardíaca de ratos submetidos a exposição crônica do herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). *Colloq Vitae* 10(3): 1-6. doi: 10.5747/cv.2018.v10.n3.v236

Razavi BM, Hosseinzadeh H, Movassaghi AR, Imenshahidi M, Abnous K. (2013) Protective effect of crocin on diazinon induced cardiotoxicity in rats in subchronic exposure. *Chemico-Biological Interactions* 203, 547–555. doi:10.1016/j.cbi.2013.03.010

Razavi BM, Hosseinzadeh H, Imenshahidi M. (2015) Evaluation of Protein Ubiquitylation in Heart Tissue of Rats Exposed to Diazinon (an Organophosphate Insecticide) and Crocin (an Active Saffron Ingredient): Role of HIF-1 α . *Drug Res (Stuttg)*. 65(11):561-566. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1384533>

Rivera-Serrano, E. E., & Sherry, B. (2017). NF- κ B activation is cell type-specific in the heart. *Virology*, 502, 133–143. doi:10.1016/j.virol.2016.12.022 *Schreinemachers* 2003

Scorrano L, Korsmeyer S. (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*. 9;304(3):437-44. doi:10.1016/s0006-291x(03)00615-6

Solgi R, Baghaei A, Golaghaei A et al (2015) Electrophysiological and molecular mechanisms of protection by iron sucrose against phosphine-induced cardiotoxicity: a time course study. *Toxicol Mech Methods*. 25(4):249-57. doi: 10.3109/15376516.2015.1015086

United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2005) Reregistration eligibility decision for 2,4-D. EPA 738-R-05-002

Vadhana MS, Nasuti C, Gabbianelli R. (2010) Purine bases oxidation and repair following permethrin insecticide treatment in rat heart cells. *Cardiovasc Toxicol*. 10(3):199-207. doi: 10.1007/s12012-010-9079-630,32

Vadhana MSD, Arumugam SS, Carloni M, Nasuti C, Gabbianelli R. (2013) Early life permethrin treatment leads to long-term cardiotoxicity. *Chemosphere*. 93(6):1029-34. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.073.

Wu, X.-Y., Luo, A.-Y., Zhou, Y.-R., & Ren, J.-H. (2014). N-acetylcysteine reduces oxidative stress, nuclear factor- κ B activity and cardiomyocyte apoptosis in heart failure. *Molecular Medicine Reports*, 10(2), 615–624. doi:10.3892/mmr.2014.2292

Zhang Z, Lapolla SM, Annis MG et al. (2004) Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax. *J Biol Chem*. 15;279(42):43920-8. doi: 10.1074/jbc.M406412200

Zhang D, Wu Y, Yuan Y (2016) Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis. *Pestic Biochem Physiol*. Sep;141:18-22. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.10.006.

ANEXO 1 - APROVAÇÃO ÉTICA

30/09/2019

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO REMODELAMENTO CARDÍACO EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO DICLOFENOCIACÉTICO (2,4-D)", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 4396 e tendo como participante(s) **RAISSA DE OLIVEIRA MANTOVANI** (discente), **FERNANDO NUNES GAVIOLI BONI** (discente), **GIOVANA RAMPAZZO TEIXEIRA** (participante externo), **YUDNEY PEREIRA DA MOTTA** (docente), **FRANCIS LOPES PACAGNELLI** (orientador responsável), foi avaliado e **APR. COM RECOMENDAÇÃO** 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 **APR. COM RECOMENDAÇÃO** em reunião realizada em 21/02/2018.

Vigência do projeto: 12/2017 a 12/2020.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Ratos mas já estão disponíveis	30	250 gramas	3 meses	M	Unoeste

Presidente Prudente, 27 de Fevereiro de 2018.

Prof. Dr. 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/sgp informando o código de segurança 5abdf73f2c528c3b177e80b4f27427

ANEXO 2 – NORMAS DE PUBLICAÇÃO

Submission guidelines

Contents

- [Instructions for Authors](#)
 - [Types of Papers](#)
 - [Manuscript Submission](#)
 - [Title Page](#)
 - [Text](#)
 - [References](#)
 - [Tables](#)
 - [Artwork and Illustrations Guidelines](#)
 - [Electronic Supplementary Material](#)
 - [English Language Editing](#)
 - [Ethical Responsibilities of Authors](#)
 - [Authorship principles](#)
 - [Compliance with Ethical Standards](#)
 - [Disclosure of potential conflicts of interest](#)
 - [Research Data Policy](#)
 - [After Acceptance](#)
 - [Open Choice](#)

Instructions for Authors

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.

[Back to top](#)

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 online” 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.

[Back to top](#)

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.

[Back to top](#)

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.

[LaTeX macro package \(Download zip, 188 kB\)](#)

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.

[Back to top](#)

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. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

- **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.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

[EndNote style \(Download zip, 3 kB\)](#)

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)

[Back to top](#)

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.

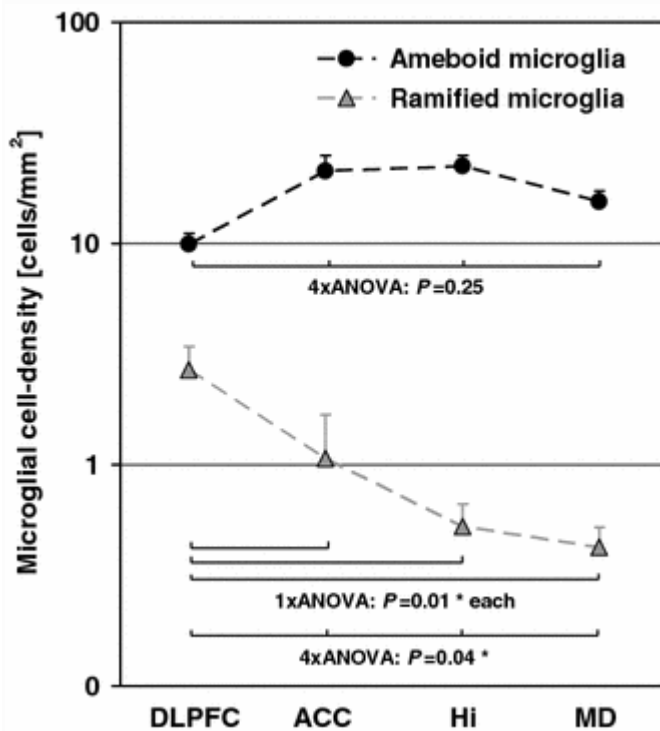
[Back to top](#)

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

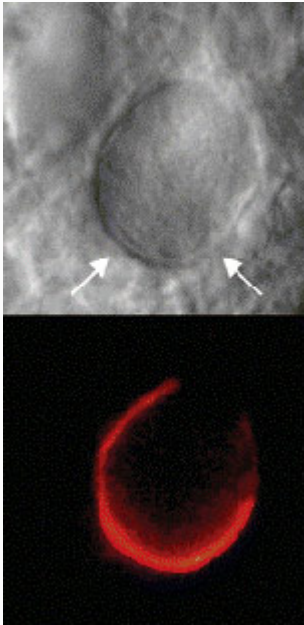
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.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

Line Art



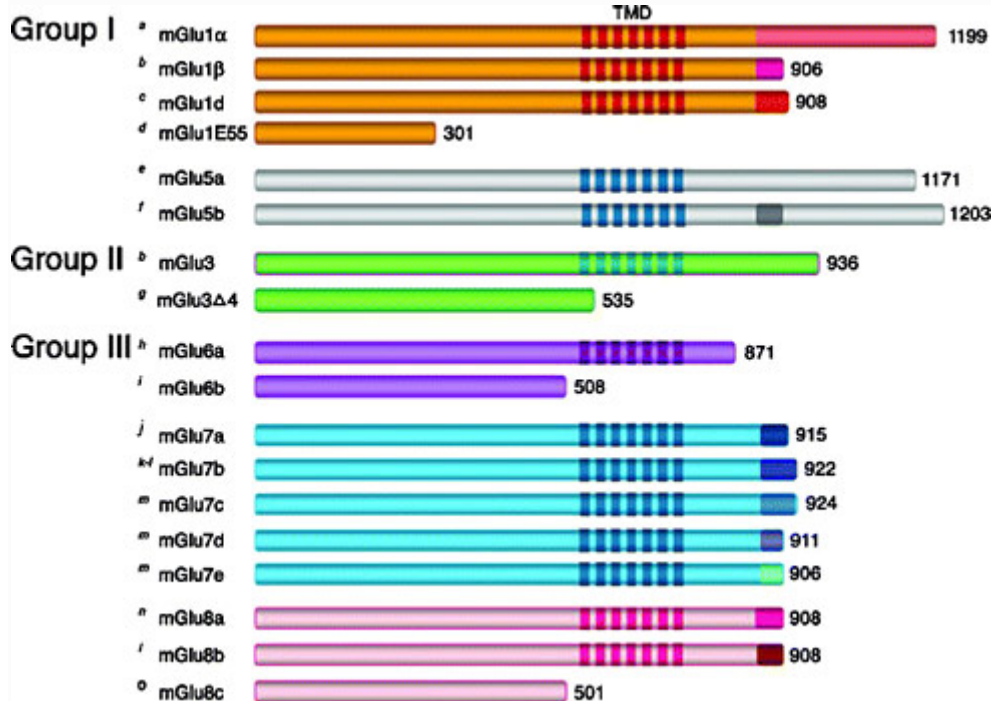
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should 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 online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

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 (Electronic Supplementary Material) 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

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- 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 (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Please note:

- Color art is free of charge for online and print publication.

[Back to top](#)

Electronic Supplementary Material

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 electronic supplementary material, 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.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxfl, 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), .wrl (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

- Electronic supplementary material 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)

[Back to top](#)

English Language Editing

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

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

[English language tutorial](#)

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted. If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

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.

[Back to top](#)

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. Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions.

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.

[Back to top](#)

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.

[Back to top](#)

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship

with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

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

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

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

[here](#):

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

See below examples of disclosures:

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

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

If no conflict exists, the authors should state:

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

[Back to top](#)

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

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at researchdata@springernature.com.

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

[Helpdesk](#)

[Back to top](#)

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

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

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

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.

[Back to top](#)

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](#)