



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

**ÉRICKA STÉPHANNY BRANDÃO BUENO**

**AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO TECIDUAL PROSTÁTICA EM RATOS  
EXPOSTOS AO BISFENOL A E AOS FITOESTRÓGENOS GENISTEÍNA E INDOL-  
3-CARBINOL DURANTE O PERÍODO PERINATAL**

Presidente Prudente - SP  
2022



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

**ÉRICKA STÉPHANNY BRANDÃO BUENO**

**AVALIAÇÃO DA REMODELAÇÃO TECIDUAL PROSTÁTICA EM RATOS  
EXPOSTOS AO BISFENOL A E AOS FITOESTRÓGENOS GENISTEÍNA E INDOL-  
3-CARBINOL DURANTE O PERÍODO PERINATAL**

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: Fisiopatologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

Presidente Prudente - SP  
2022

636.089  
B928a

Bueno, Éricka Stéphanny Brandão.

Avaliação da remodelação tecidual prostática em ratos expostos ao bisfenol A e aos fitoestrógenos genisteína e indol-3-carbinol durante o período perinatal / Éricka Stéphanny Brandão Bueno. – Presidente Prudente, 2022.

44f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2022.

Bibliografia.

Orientador: Leonardo de Oliveira Mendes.

1. Histopatologia. 2. Desreguladores Endócrinos. 3. Quimioprotetores. 4. Morfogênese Prostática. I. Título.

**ÉRICKA STÉPHANNY BRANDÃO BUENO**

**AValiação DA REMODELAÇÃO TECIDUAL PROSTÁTICA EM RATOS  
EXPOSTOS AO BISFENOL A E AOS FITOESTRÓGENOS GENISTEÍNA E INDOL-  
3-CARBINOL DURANTE O PERÍODO PERINATAL**

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: Fisiopatologia Animal

Presidente Prudente, 01 de fevereiro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes (orientador)  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

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

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Giovana Rampazzo Teixeira  
Faculdade de Ciências e Tecnologia – UNESP  
Presidente Prudente-SP

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, criador de tudo e todas as coisas. Senti sua presença ao meu lado durante todo o mestrado.

Pelo carinho, afeto, dedicação e cuidado que meus pais, José Lúcio Bueno e Vanusa Valério Bueno, me deram durante toda minha existência, dedico essa dissertação a eles. Com muita gratidão.

Ao meu querido esposo André Henrique de Souza pelo seu amor incondicional e por toda a compreensão e cumplicidade no decorrer desses anos de mestrado.

Dedico também a minha filha Sara. Você me motiva e me inspira todos os dias.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me proporcionar perseverança durante toda a minha vida.

Aos meus pais José Lúcio Bueno e Vanusa Valério Bueno pelo apoio e incentivo que serviram de alicerce para as minhas realizações.

Ao meu querido esposo André Henrique de Souza pelo seu amor incondicional e por toda a compreensão e cumplicidade no decorrer desses anos de mestrado.

A todas as minhas amigas de curso: Marcela de Andrade Bernal Fagiani, Fabíola de Azevedo Mello, Gracielle Vieira Gonçalves, Fernanda Luiza Guinossi Barbosa Deak que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos sem perder a alegria e a vontade de colaborar.

Ao meu professor orientador Leonardo de Oliveira Mendes pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo.

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano. Mas o que seria o oceano se não infinitas gotas?”. (Isaac Newton)*

## RESUMO

### **Avaliação da remodelação tecidual prostática em ratos expostos ao bisfenol A e aos fitoestrógenos genisteína e indol-3-carbinol durante o período perinatal**

Diante de tantas substâncias químicas inseridas em produtos plastificantes e resinas epóxi presentes em nosso cotidiano, destaca-se o Bisfenol A (BPA), conhecido pela sua ação direta em tecidos hormônio-dependentes, como a próstata. Alguns estudos demonstraram que a administração de baixas doses de BPA durante o início da vida, quando os tecidos são especialmente sensíveis aos desreguladores endócrinos, afetam vários aspectos do desenvolvimento prostático. Por outro lado, algumas substâncias presentes em vegetais, como o Indol-3-Carbinol (I3C) e a Genisteína (GEN), possuem ação quimioprotetora em células tumorais, através de vias de ativação e sinalização pró-apoptóticas e antiproliferativas. Logo, o presente estudo possui como objetivo analisar as características estruturais prostáticas de ratos pré-púberes, decorrentes da exposição perinatal ao BPA e aos fitoestrógenos e quantificar a porcentagem de colágeno prostático, analisando a sua distribuição no estroma prostático. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em 4 grupos experimentais: C: Controle; B: BPA (10 µg/Kg); B+G: BPA (10 µg/Kg) + GEN (5 mg/Kg); B+I: BPA (10 µg/Kg) + I3C (20 mg/Kg). Os tratamentos foram realizados nas mães, por gavagem, do dia gestacional 17 até o dia pós-natal (DPN) 21. Os animais receberam ração basal livre de fitoestrógenos e água filtrada ad libitum. Após a eutanásia no DPN22 o complexo prostático dos animais foi coletado, dissecado e processado. Para isso foi realizado a análise fractal em lâminas submetidas à coloração com hematoxilina-eosina bem como a análise da altura epitelial e estereologia. Foi realizada também a coloração com picrossirius para quantificação do colágeno estromal e análise fractal. No grupo BPA verificou-se redução do compartimento estromal quando comparado com o grupo controle. Essa redução foi revertida nos grupos que foram submetidos à administração de GEN ou I3C. Os grupos tratados com BPA e os fitoestrógenos apresentaram redução da altura epitelial quando comparados com o grupo C. Tais modificações encontradas nas análises estereo-morfométricas não foram evidenciadas pela análise fractal. Verificou-se aumento da área ocupada pelo colágeno nos grupos submetidos à administração de BPA e fitoestrógenos em relação ao grupo controle. Com relação ao padrão de distribuição dessas fibras, a análise fractal revelou maiores valores em todos os grupos tratados. Assim, verificou-se que o BPA alterou principalmente o estroma prostático, com menor influência dos fitoestrógenos na reversão destes parâmetros, o que pode afetar o desenvolvimento glandular e provocar repercussões na vida adulta.

**Palavras-chave:** Morfogênese Prostática; Quimioprotetores; Desreguladores Endócrinos; Histopatologia.



## ABSTRACT

### **Evaluation of prostatic tissue remodeling in rats exposed to bisphenol A and phytoestrogens genistein and indol-3-carbinol during the perinatal period**

Faced with so many chemical substances inserted in plasticizer products and epoxy resins present in our daily lives, Bisphenol A (BPA) stands out, known for its direct action on hormone-dependent tissues, such as the prostate. Some studies have shown that administration of low doses of BPA during early life, when tissues are especially sensitive to endocrine disruptors, affects various aspects of prostate development. On the other hand, some substances present in plants, such as Indole-3-Carbinol (I3C) and Genistein (GEN), have chemoprotective action on tumor cells, through activation of pro-apoptotic and antiproliferative signaling pathways. Therefore, the present study aims to analyze the prostatic structural characteristics of prepubertal rats, resulting from perinatal exposure to BPA and phytoestrogens and to quantify the percentage of prostatic collagen and analyzing its distribution in the prostatic stroma. Sprague-Dawley pregnant females were divided into 4 experimental groups: C: Control; B: BPA (10 µg/Kg); B+G: BPA (10 µg/Kg) + GEN (5 mg/Kg); B+I: BPA (10 µg/Kg) + I3C (20 mg/Kg). The treatments were performed on the mothers, by gavage, from gestational day 17 to postnatal day (PND) 21. The animals received phytoestrogen-free basal chow and filtered water ad libitum. After euthanasia in PND22, the animals' prostatic complex was collected, dissected and processed. For this, fractal analysis was performed on slides submitted to hematoxylin-eosin staining, as well as the analysis of epithelial height and stereology. Picrosirius staining was also performed to quantify stromal collagen and fractal analysis. In the BPA group, there was a reduction in the stromal compartment when compared to the control group. This reduction was reversed in the groups that underwent GEN or I3C administration. The groups treated with BPA and phytoestrogens showed a reduction in epithelial height when compared to the C group. Such changes found in the stereo-morphometric analyzes were not evidenced by the fractal analysis. There was an increase in the area occupied by collagen in the groups submitted to administration of BPA and phytoestrogens in relation to the control group. Regarding the distribution pattern of these fibers, fractal analysis revealed higher values in all treated groups. Thus, it was found that BPA mainly altered the prostatic stroma, with less influence of phytoestrogens in the reversal of these parameters, which can affect glandular development and cause repercussions in adult life.

**Keywords:** Prostatic Morphogenesis; Chemoprotectants; Endocrine Disruptors; Histopathology.

## LISTA DE SIGLAS

AF	– Análise Fractal
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA	– Bisfenol A
B+G	– Bisfenol A + Genisteína
B+I	– Bisfenol A + Indol-3-Carbinol
B+I+G	– Bisfenol A + Indol-3-Carbinol + Genisteína
CaP	– Câncer de Próstata
DES	– Desreguladores Endócrinos
DF	– Dimensão Fractal
DG	– Dia Gestacional
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DPN	– Dia Pós-Natal
EFSA	– European Food Safety Authority
GEN	– Genisteína
HE	– Hematoxilina-Eosina
I3C	– Indol-3-Carbinol
LME	– Limite de migração Específico
MEC	– Matriz Extracelular
MERCOSUL	– Mercado Comum do Sul
OMS	– Organização Mundial de Saúde
SD	– Sprague - Dawley

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>11</b>
	<b>ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....</b>	<b>30</b>
	<b>ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA.....</b>	<b>31</b>

## 1 ARTIGO CIENTÍFICO

### **Avaliação da remodelação tecidual prostática em ratos expostos ao bisfenol A e aos fitoestrógenos genisteína e indol-3-carbinol durante o período perinatal**

Éricka Stéphanhy Brandão Bueno<sup>1</sup>, Carlos Domingos Vieira Neto<sup>2</sup>, Alessandro Rodrigues<sup>2</sup>, Thaina Cavalleri Sousa<sup>1</sup>, Ariana Musa de Aquino<sup>3</sup>, Wellerson Rodrigo Scarano<sup>3</sup>, Joyce Zalotti Brandt<sup>3</sup>, Leonardo de Oliveira Mendes<sup>1,3\*</sup>.

**Short Title:** Histopatologia Prostática e Desreguladores Endócrinos

<sup>1</sup>*Graduate Program in Animal Science, Western São Paulo University (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro CEP 19067-175 – Presidente Prudente – SP-Brasil*

<sup>2</sup>*Faculty of Sciences, Letters and Education, Western São Paulo University (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro CEP 19067-175 – Presidente Prudente – SP-Brasil*

<sup>3</sup>*Department of Structural and Functional Biology, Bioscience Institute, IBB/UNESP, Rubião Junior, Botucatu-SP- Brasil*

<sup>3</sup>*Master Program in Health Science, Western São Paulo University (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro CEP 19067-175 - Presidente Prudente – SP-Brasil*

<sup>4</sup>*Unimed Hospital, Praça Isabel Arruda, 138, Botucatu-SP*

\*Corresponding author:

Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

Rodovia Raposo Tavares, km 572 – Bairro do Limoeiro CEP 19067-175 - Presidente Prudente – SP-Brasil

e-mail: leobio85@gmail.com

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: **Anatomia, Histologia, Embryologia ISSN (eletrônico): 1439-0264, Classificação Qualis 2020: A4.**

### **Avaliação da remodelação tecidual prostática em ratos recém-desmamados expostos ao bisfenol A e aos fitoestrógenos genisteína e indol-3-carbinol durante o período perinatal**

O Bisfenol A (BPA) é um composto químico conhecido pela sua ação direta em tecidos hormônio-dependentes, tendo como destaque a próstata. A morfogênese prostática é um período crítico e qualquer interferência pode acarretar danos permanentes a este órgão. Dessa forma, o presente estudo avaliou os aspectos morfológicos da administração de I3C e GEN em ratos machos que foram expostos durante a gestação e à lactação ao BPA. O BPA quando administrado isoladamente ocasionou aumento do compartimento estromal quando comparado ao grupo controle. Essa redução foi revertida nos grupos que foram submetidos à administração de GEN ou I3C. Os grupos tratados com BPA e os fitoestrógenos apresentaram redução da altura epitelial quando comparados com o grupo C. Tais modificações encontradas nas análises estéreo-morfométricas não foram evidenciadas pela análise fractal. Verificou-se aumento da área ocupada pelo colágeno nos grupos submetidos à administração de BPA e fitoestrógenos em relação ao grupo controle. Com relação ao padrão de distribuição dessas fibras, a análise fractal revelou maiores valores em todos os grupos tratados. Assim, verificou-se que o BPA alterou principalmente o estroma prostático, com menor influência dos fitoestrógenos na reversão destes parâmetros, o que pode afetar o desenvolvimento glandular e provocar repercussões na vida adulta.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve aumento na disseminação de substâncias químicas presentes no meio ambiente que possuem a capacidade de interferir no metabolismo hormonal. Estas substâncias são denominadas de desreguladores endócrinos (DES) e são apontadas como possíveis responsáveis por causarem efeitos tóxicos mesmo quando a sua exposição ocorre em baixas doses (Zhou et al., 2018). São agentes capazes de interferirem na produção, transporte, liberação, ligação e até na eliminação dos hormônios endógenos (Kavlock et al., 1996). Nesta categoria dos DES se encaixam as substâncias classificadas como os alquifenois, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas (PDBs) e plastificantes, como o Bisfenol A (Bila; Dezzoti, 2007).

O Bisfenol A, mais conhecido como BPA, é um monômero sintético utilizado para a produção de resinas plásticas de policarbonato e epóxi (Brandt J. Z. et. al. 2013). Por atuar de forma semelhante aos hormônios endógenos, é considerado um desregulador endócrino, estando o ser humano exposto através dos alimentos e bebidas, bem como através da absorção pela pele (Calafat et al., 2008; Zhang et al., 2011). Esta exposição, por sua vez, pode desencadear problemas ao ser humano em vários estágios de desenvolvimento, sendo o período fetal um dos mais críticos, devido a capacidade do BPA de atravessar a placenta. Tal fato é proporcionado pela estrutura química similar deste composto aos estrógenos, como o estradiol e dietilestilbestrol (Hu et al., 2016), sendo capaz de agir diretamente na remodelação tecidual reprodutiva (Campos et al., 2015).

Um dos órgãos do sistema reprodutor mais susceptível à ação do BPA é a próstata, devido à sua característica hormônio-dependente e sua grande janela de susceptibilidade. Como o seu desenvolvimento inicia-se na fase intrauterina e termina após o nascimento, a exposição gestacional e lactacional torna-se um período crítico para avaliação dos efeitos de compostos químicos sobre a morfogênese deste órgão (McNeal, 1986). Além disso, também há indícios claros de sua ação estimulando a proliferação de células prostáticas, além de induzir alterações morfológicas (Ogura et al., 2007; Ramos et al., 2001; Timms et al., 2005; Wu et al., 2016).

Conforme estudos prévios, outras substâncias podem também agir no microambiente prostático, mas de forma positiva, como é o caso dos fitoquímicos. Tais compostos estão associados a efeitos pro-apoptóticos, anti-inflamatórios e antiproliferativos (Dave et al., 2005; Li et al., 2005), podendo reverter os efeitos nocivos causados pelo BPA.

Dentre estas substâncias fitoquímicas, se destacam a Genisteína (GEN) e o Indol-3-Carbinol (I3C).

No que se refere à GEN, esta tem como principal fonte alimentos derivados da soja (Chao, 2008). É conhecida por sua atuação inibindo a proliferação celular e a angiogênese (Setchell, 1998), além de apresentar outras funções antitumorais em células hormônio-dependentes (Mahmoud et al., 2014). Importante ressaltar, segundo relatado por Nagata et al. (2006), que a GEN é capaz de ser transportada através da placenta para o feto, onde foi encontrado altos níveis séricos dessa isoflavona.

Outro fitoquímico que apresenta destaque na literatura científica é o I3C, principal composto bioativo encontrado em altas concentrações em vegetais da família Brassicaceae (incluindo brócolis, couve-flor, couve de Bruxelas e repolho). Em animais expostos ao BPA durante o período perinatal, o I3C anulou a resposta ao estrogênio e diminuiu a expressão do receptor, propiciando um potencial efeito antitumoral, bem como revertendo as alterações teciduais prostática (Brandt et al., 2014). A quimioproteção realizada pelos fitoquímicos dietéticos está relacionada à redução na incidência e progressão de diferentes neoplasias, causando redução de processos inflamatórios e estresse oxidativo ocasionados por substâncias potencialmente nocivas, como o BPA (Bilir et al., 2017; Křížová et al., 2019).

Para auxiliar na avaliação das alterações histopatológicas causadas pela ação de desreguladores endócrinos surge a análise fractal, um método quantitativo muito útil para determinar estruturas complexas dos objetos com um valor mensurável, indicando a variação de uma estrutura à medida que esta é vista em diferentes escalas (Tambasco et al., 2009). A análise é feita através da relação entre a resolução e a escala onde o objeto é avaliado, tendo o seu resultado expresso por uma equação. Na urologia, a análise da dimensão fractal tem sido regularmente usada no estudo do tecido tumoral prostático (De Arruda et al., 2013).

A característica majoritariamente qualitativa das análises morfológicas torna a avaliação da remodelação tecidual causada pelos DE ainda incerta, caracterizando-se por interpretações subjetivas e imprecisas, necessitando, desta forma, de ferramentas e validações, no que se refere a análise destes dados de forma quantitativa e precisa. Assim, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar, com auxílio da dimensão fractal, a remodelação tecidual prostática frente à exposição ao BPA e avaliar o possível papel protetor dos fitoquímicos sobre este processo.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais e Ambiente de Experimentação

Ratos machos e fêmeas da linhagem *Sprague-Dawley* (SD) em idade reprodutiva foram adquiridos do CEMIB-UNICAMP (Campinas-SP) e mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu. Os animais foram distribuídos na proporção de três fêmeas e um macho adulto (3:1) para acasalamento por gaiola e, posteriormente, a prole em dois machos 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 duas vezes por semana.

Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério como: temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar ( $55 \pm 10\%$ ), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. Todos os animais receberam ração comercial livre de fitoestrógenos (NUVILAB-CR1/Nuvital-PR) 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 procedimentos de manuseio, administração de drogas, anestesia e eutanásia dos animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo CEUA 1024-2013).

### Bisfenol A, Indol-3-Carbinol e Genisteína

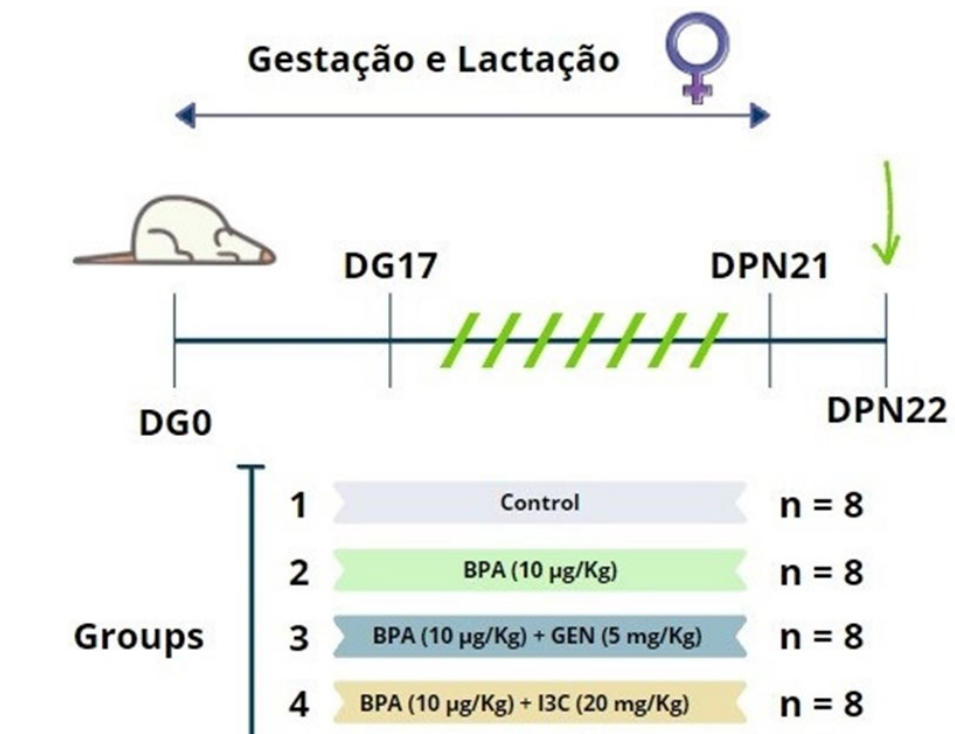
O BPA e os fitoestrógenos I3C e GEN foram adquiridos da empresa (Sigma-Aldrich – St. Louis, Mo, EUA). O BPA foi diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) (veículo) na dose de 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$  (PRINS et al., 2007; 2008), enquanto os fitoquímicos I3C e GEN foram diluídos em óleo de milho nas doses de 20  $\text{mg}/\text{Kg}/\text{dia}$  (WU et al., 2011) e 5  $\text{mg}/\text{kg}/\text{dia}$  (LEE et al., 2004; KALUDJEROVIC et al., 2012), respectivamente. Todas as substâncias foram administradas por via oral (gavagem) nas fêmeas, conforme descrito abaixo.



### Delineamento Experimental

Após o período de aclimação, três fêmeas foram colocadas com um macho por gaiola por 12h (período escuro). A presença de esperma no esfregaço vaginal e a citologia vaginal positiva da fase de estro foram consideradas como indicadoras do dia gestacional zero (DG0). As fêmeas consideradas prenhes foram mantidas individualmente nas gaiolas.

Grupos de fêmeas prenhes (n=8/grupo) foram expostas ao BPA por via oral (gavagem) (10 µg/Kg/dia) como também ao I3C (20 mg/Kg) e à GEN (5 mg/Kg) do DG17 ao dia pós-natal 21 (DPN21), período de morfogênese prostática (MARKER et al., 2003; VILAMAIOR et al., 2006; PRINS et al., 2007). Durante esse período as fêmeas receberam ração basal livre de fitoestrógenos e água *ad libitum*. Sendo assim, foram formados quatro grupos experimentais Controle (C); BPA (B); BPA+GEN (BG) e BPA+I3C (BI). Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para oito, sendo preferencialmente quatro fêmeas e quatro machos.



**Figura 1.** Representação esquemática do delineamento experimental. Os traços verdes referem-se ao período de tratamento das ratas prenhes (DG17 à DPN21). A seta verde (DPN22) corresponde ao momento da eutanásia. DG (Dia Gestacional); DPN (Dia Pós-Natal).

No DPN22 os animais foram anestesiados em câmara de CO<sub>2</sub> e eutanasiados por decapitação, sendo o complexo prostático dos animais removido e utilizado para as análises histológicas. Durante todo o período experimental foi realizado acompanhamento do estado clínico dos animais.

O uso de CO<sub>2</sub> é um método de eutanásia aceito com algumas restrições (de acordo com a recomendação da Resolução Normativa nº 37 – 15 de fevereiro de 2018 do CONCEA – Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal) e foi adotado nesta pesquisa em virtude das análises hormonais (realizadas em outro estudo) e embasado pela literatura científica (DECKARDT et al., 2007; NAZIAN et al., 1988).

### **Análise da estrutura prostática**

Os fragmentos prostáticos do segmento intermediário foram fixados por imersão em metacarn (6 metanol: 3 clorofórmio: 1 ácido acético) e preservados em álcool 70%. Na sequência, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol, clarificado em xilol e incluído em historesina.

Os fragmentos de próstata ventral incluídos em historesina foram seccionados com 4µm de espessura em micrótomo rotativo e submetidos às seguintes colorações:

**1. Hematoxilina - Eosina (HE):** análise da dimensão fractal, altura epitelial e análise estereológica;

**2. Picrossírius – hematoxilina:** evidenciar e quantificar o volume relativo de colágeno e análise da dimensão fractal.

As lâminas foram analisadas e os campos microscópicos digitalizados utilizando o sistema de análise de imagens (*Image Pro-Plus*) acoplado ao fotomicroscópio Leica.

### **Análise Estereológica**

A análise estereológica foi realizada em secções histológicas coradas com H.E de 8 animais/grupo (1 animal/ninhada), sendo fotografados 10 campos histológicos/secção, aumento de 40x, e mensurada a proporção epitélio, lúmen e estroma. A Grade de Weibel, que contém 168 pontos e 84 linhas, foi sobreposta à secção histológica e, através do software Contador, foi estimada quantitativamente a proporção ocupada entre os compartimentos da próstata nos diferentes grupos experimentais.

### **Análise da Altura do Epitélio**

A altura do epitélio do tecido prostático foi feita em secções histológicas coradas com H.E seguindo as instruções do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Foram analisadas secções histológicas de 8 animais/grupo, coradas com H.E, sendo fotografados 10 campos histológicos/secção, aumento de 40x e medidas 5 áreas distintas para cada foto através da ferramenta de seleção em linha reta (line selection tools straight-line). Para realizar as medidas, é necessária uma padronização realizada pela seleção em linha reta da barra de 10 $\mu$ m, seguido da seleção da escala (ferramenta Analyze: Set Scale). O padrão encontrado (escala de 6.3001 pixels/ $\mu$ m) foi aplicado para a medida de todas as imagens.

### **Dimensão Fractal**

Para análise da dimensão fractal foram analisadas secções histológicas de 8 animais/grupo, coradas com HE e picrossírius, sendo fotografadas 10 campos histológicos/secção, aumento de 40x, binarizadas para leitura e a dimensão fractal estimada pelo método box-counting, por meio do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). O software considerou o box-counting 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, possuem a mesma dimensão fractal.

A análise das lâminas histológicas fractais baseou-se na relação entre a resolução e a escala avaliada, e o resultado fora quantitativamente expresso como a dimensão fractal do objeto que é  $DF = (\log N_r / \log r - 1)$ , sendo  $N_r$  a quantidade de elementos iguais necessários para preencher o objeto original e  $r$  a escala aplicada ao objeto. Com isso, a dimensão fractal foi calculada com o software Image J ficando sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes e averiguando a relação entre núcleo e citoplasma nas células do epitélio prostático dos diferentes grupos experimentais.

### **Quantificação do Volume Relativo de Colágeno**

O volume relativo de colágeno foi quantificado nas secções histológicas coradas com picrossírius através das etapas: Type – RGB Stack – Filtro 2 – Ctrl+Shift+T – Ctrl+M,

encontradas no software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Foram analisadas secções histológicas de 5 animais/grupo, coradas com picrossírius, sendo fotografadas (10 campos histológicos/secção, aumento de 40x).

### **Análise Estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e, por apresentarem natureza não paramétrica, foram posteriormente analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis e as medianas comparadas pelo teste de Dunn. Em todas as análises foi adotado o valor de 5% de significância (ZAR, 2009).

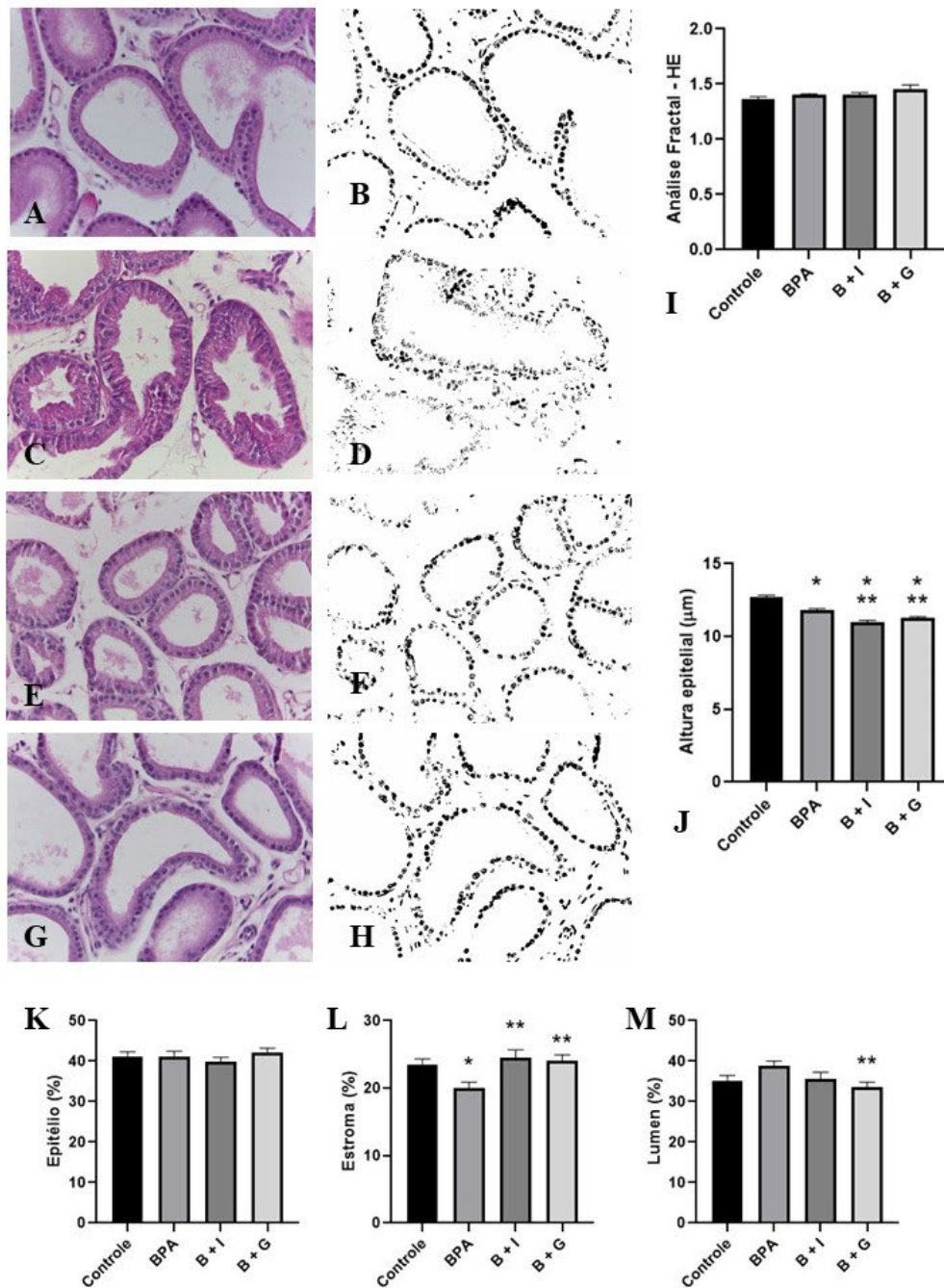
As análises estatísticas referidas foram empregadas com o objetivo de comparar os resultados obtidos entre o grupo controle.

## **3 RESULTADOS**

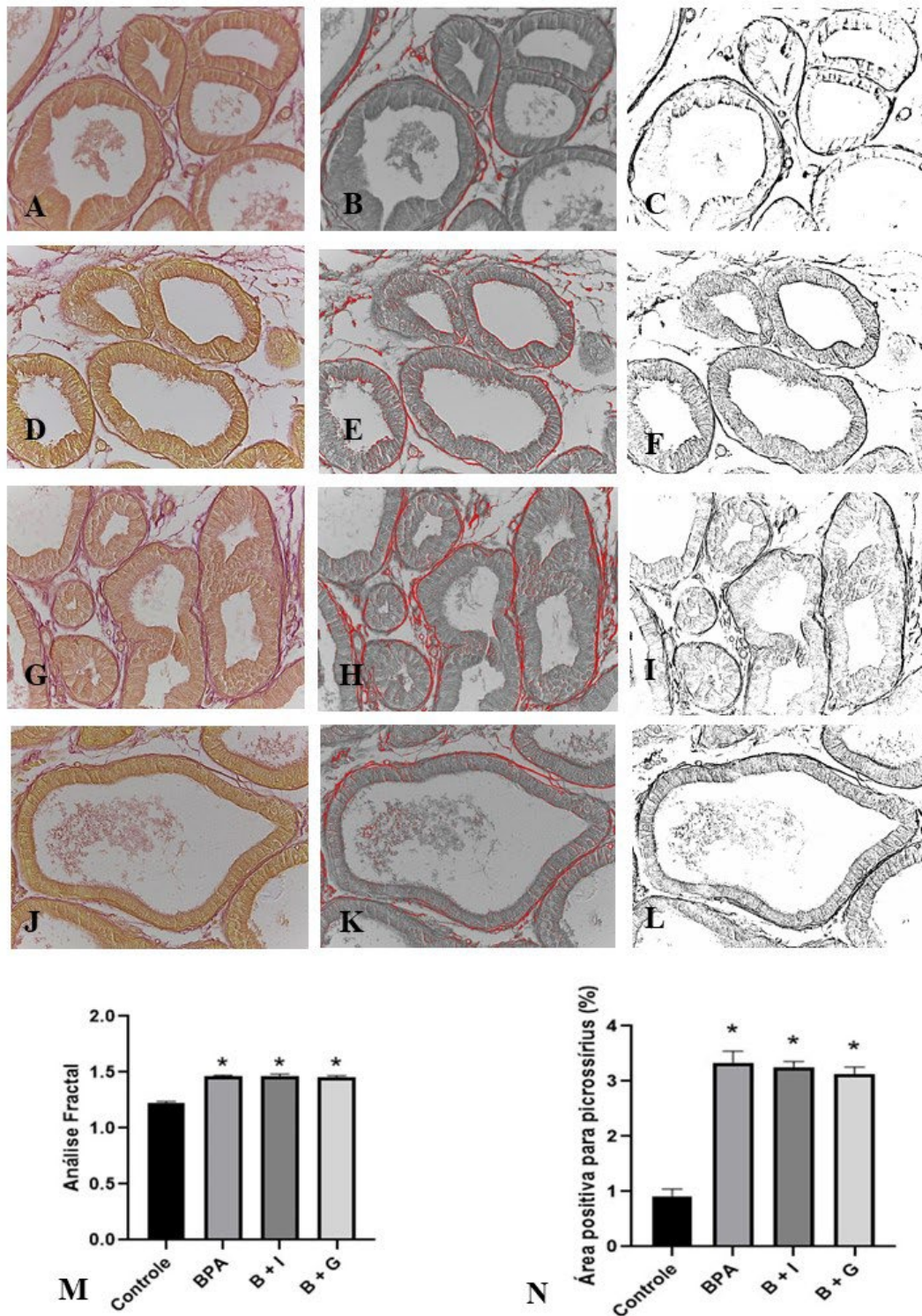
A análise estereológica revelou que o BPA, quando administrado isoladamente, ocasionou redução do compartimento estromal quando comparado com o grupo controle (Figura 2C, L). Essa redução foi revertida nos grupos que foram submetidos à administração de GEN ou I3C isoladamente (Figura 2E, G, L).

No grupo submetido à administração de GEN também foi observado redução do compartimento luminal quando comparado aos animais que receberam somente BPA (Figura 2G, M). Com relação ao epitélio, este apresentou menor altura nos grupos submetidos à administração de BPA, com os fitoquímicos não conseguindo reverter a atrofia (Figura 2J). Por outro lado, em relação à proporção que este compartimento ocupa no tecido prostático, a administração tanto de BPA quanto dos fitoquímicos não provocou alterações quando comparado ao grupo controle (Figura 2K). Apesar das alterações observadas causadas pelo BPA, a dimensão fractal foi semelhante entre os grupos experimentais (Figura 2I).

Com relação ao colágeno estromal, houve aumento da área ocupada por estas fibras nos grupos submetidos à administração de BPA ou dos fitoestrógenos em relação ao grupo controle (Figura 3N). Além disso, a alteração no padrão de distribuição dessas fibras foi verificada pela análise fractal, com maiores valores em todos os grupos tratados (Figura 3M).



**Figura 2.** Secções histológicas representativas da análise fractal, altura epitelial e análise estereológica na próstata de ratos expostos ao bisfenol A (BPA) e aos fitoestrógenos quimioprotetores genisteína (G) e indol-3-carbinol (I). Características morfológicas e a correspondente imagem obtida após o processo de binarização em animais dos grupos: Controle (A e B), Grupo BPA (C e D), B + I (E e F) e B + G (G e H). Representação gráfica da análise fractal (I), altura epitelial (J), e análise estereológica (K, L, M) em Aumento de 400X. Coloração: H.E.



**Figura 3.** Secções histológicas na próstata de ratos expostos ao bisfenol A (BPA) e aos fitoestrógenos quimioprotetores genisteína (G) e indol-3-carbinol (I). Características morfológicas do estroma prostático em animais do grupo Controle (A – C), BPA (D – F), B+I (G – I) e B+G (J – L). Os gráficos representam a área ocupada pelo colágeno (N) e a análise fractal deste componente (M). Aumento de 400X. Coloração: Picrosírius.

## 4 DISCUSSÃO

A partir dos resultados do presente estudo foi possível evidenciar as alterações morfológicas prostáticas propiciadas pela exposição gestacional e lactacional ao BPA e aos fitoquímicos GEN e I3C. Estas alterações foram mais pronunciadas no compartimento estromal, onde o BPA provocou a diminuição deste compartimento e aumento da proporção ocupada pelo colágeno. Os fitoquímicos, por sua vez, conseguiram aumentar a proporção ocupada pelo compartimento estromal sem, contudo, reverter o aumento do colágeno, mantendo a dimensão fractal semelhante ao grupo BPA. Assim evidencia-se o potencial tóxico deste composto plástico, previamente retratado por Marker et al. (2003).

As alterações no colágeno estromal observadas neste estudo corroboram com o trabalho de Brandt et al. (2014), no qual foi demonstrado que a exposição ao BPA causa aumento da densidade de colágeno e de fibras reticulares ao redor dos ácinos prostáticos. Este aumento é consequência da mudança no padrão de brotamento devido a exposição perinatal ao BPA, alterando a distribuição, quantidade e agregação dos elementos da matriz extracelular, o que também foi relatado por Prins et al., (2007); Scarano et al., (2005); Tilley et al., (1989). Outros autores também relatam que a administração de compostos que mimetizam o estrógeno são responsáveis por aumentar o compartimento estromal (Prins et al., 2007; Scarano et al., 2005; 2008; Brandt et al., 2014)

Aumento do compartimento estromal e consequente redução do compartimento luminal também foi relatada por Bernardo et al. (2015) nas doses de 25µg/kg/dia e 250µg/kg/dia de BPA durante o período perinatal, sem observar alterações no compartimento epitelial. Além disso, os autores evidenciaram um potencial protetivo da GEN, que reverteu a hiperplasia estromal.

Assim, verificou-se que a administração do BPA proporcionou alterações no microambiente prostático nos animais expostos durante a gestação e lactação. Golub et al. (2010) e Rochester (2013) verificaram que a exposição perinatal ao BPA pode alterar significativamente a citoarquitetura prostática bem como sua homeostase, podendo refletir em efeitos a longo prazo de vida. Corroborando com essas informações, Prins et al. (2007) destacaram que esta exposição precoce ao BPA pode, por sua vez, interferir no que se diz

respeito ao desenvolvimento prostático, chegando até mesmo à indução de metaplasias, hiperplasias e inflamações na fase adulta.

Conforme relatado por Bernardo et al. (2015), a utilização da GEN na dieta materna pode atenuar os efeitos deletérios ao desenvolvimento prostático decorrentes da exposição gestacional a doses baixas de BPA, tendo em vista que a GEN é facilmente transferida através da placenta humana (Balakrishnan et al., 2010). Por outro lado, resultados controversos são expostos por Kong et al. (2013), que afirmam que a genisteína, quando em baixas doses, pode atuar como uma substância tóxica, podendo resultar em alterações comportamentais e reprodutivas, necessitando assim de maiores estudos para se determinar os seus efeitos no microambiente prostático.

Brandt et al. (2014) afirmaram que o I3C é capaz de atenuar os efeitos deletérios da exposição gestacional ao BPA, desempenhando um papel quimioprotetor na próstata. De acordo com Weng et al. (2008), Kim et al. (2013), Brandt et al. (2014) e Liu et al. (2014), o I3C pode agir como um inibidor da proliferação celular, possuindo propriedades antitumorais. Tal característica pode ser atribuída à capacidade deste fitoquímico em inibir a metaloproteinase do tipo II, enzima responsável pela degradação do colágeno, culminando com o acúmulo desta proteína no estroma prostático e, conseqüentemente, inibindo possíveis processos metastáticos (Hung e Cheng, 2009). De maneira semelhante, Duchnik et al. (2019) afirmaram, por meio da sua pesquisa envolvendo a exposição à isoflavonas de soja do período perinatal até a maturidade sexual, que estes compostos vegetais conseguem atuar de forma benéfica na síntese de colágeno, pelo aumento da expressão do componente na pele de ratos adultos.

Ainda não se tem um consenso científico a respeito dos efeitos do BPA no microambiente prostático, principalmente no que se refere às doses e os períodos de exposição. Brandt et al. (2014) e Bernardo et al. (2015) relatam que em doses de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  temos o inverso do que foi apresentado no presente trabalho, com o aumento do compartimento estromal e a diminuição do compartimento luminal. Em contrapartida, na dose de 250  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$  ocorre o aumento do compartimento luminal e diminuição do compartimento estromal, mostrando que os efeitos são dose-resposta.

Em virtude dessa ampla gama de resultados discrepantes na literatura científica, o uso de ferramentas que proporcionem uma análise morfológica mais fidedigna torna-se necessário. Desta forma, o uso da análise fractal, embora seja questionado por alguns



estudos, como os de Waliszewski et al. (2015) e Waliszewski et al. (2016), que afirmaram não se ter um consenso entre histologia e dimensão fractal, autores como Arruda et al (2013), propuseram que uma maior dimensão fractal está associada com maior desorganização tecidual. Na contramão deste resultado, Pu et al. (2012) revelaram valores maiores para este parâmetro em tecidos não tumorais. Sendo assim, apesar dos resultados contrastantes observados na literatura científica ao tentar se obter um padrão de resposta para a técnica, está claro que esta se mostra eficaz em detectar diferenças histológicas entre tecidos, corroborando com outras análises, como as empregadas neste estudo.

Desta forma, por meio das análises realizadas no presente estudo, pode-se concluir que o BPA foi capaz de alterar o microambiente prostático de animais pré-púberes, principalmente o compartimento estromal, sem influência dos fitoestrógenos, podendo, assim, afetar a homeostasia prostática na vida adulta. Somado a estes achados, validamos a utilização da análise fractal como ferramenta de avaliação das alterações na morfologia prostática causadas pela exposição ao BPA e aos fitoestrógenos.

## 6 REFERÊNCIAS

- Bila, D. M., & Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, *30*(3), 651–666. <https://doi.org/10.1590/S0100-4042200700030002>.
- Bilir, B., Sharma, N. v., Lee, J., Hammarstrom, B., Svindland, A., Kucuk, O., & Moreno, C. S. (2017). Effects of genistein supplementation on genome-wide DNA methylation and gene expression in patients with localized prostate cancer. *International Journal of Oncology*, *51*(1), 223–234. <https://doi.org/10.3892/IJO.2017.4017>.
- Brandt, J. Z., Silveira, L. T. R., Grassi, T. F., Anselmo-Franci, J. A., Fávaro, W. J., Felisbino, S. L., Barbisan, L. F., & Scarano, W. R. (2014). Indole-3-carbinol attenuates the deleterious gestational effects of bisphenol A exposure on the prostate gland of male F1 rats. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *43*, 56–66. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2013.11.001>.
- Balakrishnan, B., Thorstensen, E. B., Ponnampalam, A. P., & Mitchell, M. D. (2010). Transplacental Transfer and Biotransformation of Genistein in Human Placenta. *Placenta*, *31*(6), 506–511. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2010.03.007>.
- Bernardo, B. D., Brandt, J. Z., Grassi, T. F., Silveira, L. T. R., Scarano, W. R., & Barbisan, L. F. (2015). Genistein reduces the noxious effects of in utero bisphenol A exposure on the rat prostate gland at weaning and in adulthood. *Food and Chemical Toxicology*, *84*, 64–73. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2015.07.011>.
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008). Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, *116*(1), 39. <https://doi.org/10.1289/EHP.10753>.

Campos, M. S., Galvão, A. L. V., Rodríguez, D. A. O., Biancardi, M. F., Marques, M. R., Vilamaior, P. S. L., Santos, F. C. A., & Taboga, S. R. (2015). Prepubertal exposure to bisphenol-A induces ER $\alpha$  upregulation and hyperplasia in adult gerbil female prostate. *International Journal of Experimental Pathology*, *96*(3), 188–195. <https://doi.org/10.1111/IEP.12120>.

Chao, W. X. (2008). Health effects of soy protein and isoflavones in humans. *The Journal of Nutrition*, *138*(6). <https://doi.org/10.1093/JN/138.6.1244S>.

de Arruda, P. F., Gatti, M., Facio, F. N. Jr., de Arruda, J. G., Moreira, R. D., Murta, L. O. Jr., de Arruda, L. F., & de Godoy, M. F. (2013). Quantification of fractal dimension and Shannon's entropy in histological diagnosis of prostate cancer. *BMC clinical pathology*, *13*(6). Doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6890-13-6>.

Dave, B., Eason, R. R., Till, S. R., Geng, Y., Velarde, M. C., Badger, T. M., & Simmen, R. C. M. (2005). The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. *Carcinogenesis*, *26*(10), 1793–1803. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGI131>.

Deckardt, K., Weber, I., Kaspers, U., Hellwig, J., Tennekes, H., & van Ravenzwaay, B. (2007). The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *45*(9), 1709–1718. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2007.03.005>.

Duchnik, E., Kruk, J., Baranowska-Bosiacka, I., Pilutin, A., Maleszka, R., & Marchlewicz, M. (2019). Effects of the soy isoflavones, genistein and daidzein, on male rats' skin. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, *36*(6), 760–766. <https://doi.org/10.5114/ADA.2019.87280>.

Golub, M. S., Wu, K. L., Kaufman, F. L., Li, L. H., Moran-Messen, F., Zeise, L., Alexeeff, G. v., & Donald, J. M. (2010). Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposurea. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, *89*(6), 441–466. <https://doi.org/10.1002/BDRB.20275>.

Ho, S. M., Tang, W. Y., Belmonte De Frausto, J., & Prins, G. S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research*, *66*(11), 5624–5632. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0516>.

Hu, Y., Zhang, L., Wu, X., Hou, L., Li, Z., Ju, J., Li, Q., Qin, W., Li, J., Zhang, Q., Zhou, T., Zhang, L., Xu, C., Fang, Z., & Zhang, Y. (2016). Bisphenol A, an environmental estrogen-like toxic chemical, induces cardiac fibrosis by activating the ERK1/2 pathway. *Toxicology Letters*, *250–251*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2016.03.008>.

Hung, W. C., & Chtimang, H. C. (2009). Indole-3-carbinol inhibits Sp1-induced matrix metalloproteinase-2 expression to attenuate migration and invasion of breast cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(1), 76–82. <https://doi.org/10.1021/JF802881D>.

Kaludjerovic, J., Chen, J., & Ward, W. E. (2012). Early life exposure to genistein and daidzein disrupts structural development of reproductive organs in female mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, *75*(11), 649–660. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.688482>.

Kim, E. K., Kim, Y. S., Milner, J. A., & Wang, T. T. Y. (2013). Indole-3-carbinol and 3',3'-diindolylmethane modulate androgen's effect on C-C chemokine ligand 2 and monocyte attraction to prostate cancer cells. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *6*(6), 519–529. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0419>.

Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T., & Tilson, H. A. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, *104*(Suppl 4), 715. <https://doi.org/10.1289/EHP.96104S4715>.

Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J., & Kašparovský, T. (2019). Isoflavones. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24061076>.

Kong, D., Xing, L., Liu, R., Jiang, J., Wang, W., Shang, L., Wei, X., & Hao, W. (2013). Individual and combined developmental toxicity assessment of bisphenol A and genistein using the embryonic stem cell test in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 497–505. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2013.08.006>.

Lee, B. J., Jung, E. Y., Yun, Y. W., Kang, J. K., Baek, I. J., Yon, J. M., Lee, Y. B., Sohn, H. S., Lee, J. Y., Kim, K. S., & Nam, S. Y. (2004). Effects of exposure to genistein during pubertal development on the reproductive system of male mice. *The Journal of Reproduction and Development*, 50(4), 399–409. <https://doi.org/10.1262/JRD.50.399>.

Liu, A. G., Juvik, J. A., Jeffery, E. H., Berman-Booty, L. D., Clinton, S. K., & Erdman, J. W. (2014). Enhancement of broccoli indole glucosinolates by methyl jasmonate treatment and effects on prostate carcinogenesis. *Journal of Medicinal Food*, 17(11), 1177–1182. <https://doi.org/10.1089/JMF.2013.0145>.

Li, Y., Ahmed, F., Ali, S., Philip, P. A., Kucuk, O., & Sarkar, F. H. (2005). Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Research*, 65(15), 6934–6942. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4604>.

Marker, P.C; Donjacour, AA; Dahiya, R; et al. Hormonal, cellular and molecular control of prostatic development. *Developmental Biol*, v. 253, p. 165-174, 2003.

McNeal JE, Bostwick DG, Kindrachuk RA, et al. Patterns of progression in prostate cancer. *Lancet* 1986;1:60.

Nazian, S . J. Serum concentrations of reproductive hormones after administration of various anesthetics to immature and young adult male rats. *Proc SocExpBiol Med*, v. 187, p. 482-7, 1988.

Prins, G. S. et al. Perinatal Exposure to Oestradiol and Bisphenol A Alters the Prostate Epigenome and Increases Susceptibility to Carcinogenesis. *Clinical Pharmacology*, p. 5, 2008.

Prins, G; Birch, L; Tang, W; et al. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reproductive Toxicology*, v. 23, n. 3, p. 374–382, 2007.

Setchell, K D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, n. 6, p. 1333S-1346S, 1998

Tambasco, M.; Costello, B. M.; Kouznetsov, A.; et al. Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron*, v. 40, n. 4, p. 486–494, 2009.

Vilamaior, P. S.L.; Taboga, S. R.; Carvalho, H. F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, v. 288A, n. 8, p. 885–892, 2006.

Waliszewski, P. Computer-Aided Image Analysis and Fractal Synthesis in the Quantitative Evaluation of Tumor Aggressiveness in Prostate Carcinomas. *Frontiers in Oncology*, v. 6, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2016.00110/abstract>>. Acesso em: 19 set. 2021.

Waliszewski, P.; Wangenlehner, F.; Gattenlöhner, S.; et al. On the relationship between tumor structure and complexity of the spatial distribution of cancer cell nuclei: A fractal geometrical model of prostate carcinoma: Grading and Complexity. *The Prostate*, v. 75, n. 4, p. 399–414, 2015.

Weng, Jing-Ru; TSAI, Chen-Hsun; KULP, Samuel K.; et al. Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Letters*, v. 262, n. 2, p. 153–163, 2008.

Wu JH, Jiang XR, Liu GM, Liu XY, He GL, Sun ZY. Oral exposure to low-dose bisphenol A aggravates testosterone-induced benign hyperplasia prostate in rats. *Toxicol Ind Health*. 2011 27: 810-819.

Zar, J.H. *Bioestatistical analysis*. 5.ed. Prentice Hall, 2009.

Zhou, Xinyi; YANG, Zhaoguang; LUO, Zhoufei; et al. Endocrine disrupting chemicals in wild freshwater fishes: Species, tissues, sizes and human health risks. *Environmental Pollution*, v. 244, p. 462–468, 2019.

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

23/11/2020

Certificado

### UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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

## Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE FRACTAL PROSTÁTICA EM RATOS SUBMETIDOS À CARCINOGENESE HORMONAL E EXPOSTOS AO BISFENOL A E AOS FITOESTRÓGENOS QUIMIOPROTETORES GENISTEÍNA E INDOL-3-CARBINOL DURANTE O PERÍODO PERINATAL", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5618 e tendo como participante(s) CAMILA BONILLO (discente), THAINA CAVALLERI SOUSA (discente), LEONARDO DE OLIVEIRA MENDES (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 29/05/2019.

#### MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
472	08/03/2013	UNOESTE	SIM	blocos de parafina no laboratório do IBB/UNESP

Presidente Prudente, 19 de Agosto de 2020.

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

Prof. Ms. Adriana Falcó 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](http://www.unoeste.br/sgp) informando o código de segurança c1791ecc0ef23eddc1b02cecb1f7dea

## ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA

### 1. SUBMISSION

Thank you for your interest in ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA. Note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

New submissions should be made via the Research Exchange submission portal <https://wiley.atyponrex.com/journal/AHE>. Should your manuscript proceed to the revision stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at any time by logging on to [submission.wiley.com](http://submission.wiley.com) and clicking the “My Submissions” button. For technical help with the submission system, please review our [FAQs](#) or contact [submissionhelp@wiley.com](mailto:submissionhelp@wiley.com).

The submission system will prompt you to use an ORCID (a unique author identifier) to help distinguish your work from that of other researchers. Click [here](#) to find out more.

[Click here](#) for more details on how to use Research Exchange.

For help with submissions, please contact: [AHEoffice@wiley.com](mailto:AHEoffice@wiley.com)

We look forward to your submission.

### Equity, Diversity and Inclusion

ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA aims to foster inclusive research that reflects the disciplinary, human, and geographic diversity of scientists, clinicians and other health professionals working in this area. Submissions are welcomed from authors of all ethnicities, races, colours, religions, sexes, sexual orientations, gender identities, national origins, disabilities, ages, or other individual status.

### Data Sharing and Data Availability

This journal expects data sharing. Review [Wiley's Data Sharing policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is right for your submission.

### Data Protection and Privacy

By submitting a manuscript to, or reviewing for, this publication, your name, email address, institutional affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

### Preprint Policy



ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA will consider for review articles previously available as preprints. Authors may also post the [submitted version](#) of a manuscript to a preprint server at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

## 2. AIMS AND SCOPE

ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA is a premier international forum for the latest research on descriptive, applied and clinical anatomy, histology, embryology, and related fields. Special emphasis is placed on the links between animal morphology and veterinary clinics, consequently studies on clinical relevant species, including laboratory animals, will be given priority. The editors welcome papers on medical imaging and anatomical techniques. The journal is of vital interest to clinicians, zoologists, obstetricians, and researchers working in biotechnology. Contributions include reviews, original research articles, short communications and book reviews.

## 3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA publishes a number of different article types including:

- **Original Article**

Original articles should contain reports of new research findings or conceptual analyses that make a significant contribution to knowledge. Original articles should be no more than 4,000 words, excluding references. Summaries of original papers should not exceed 250 words.

- **Review**

Reviews should be critical reviews of the literature, including systematic reviews and meta-analyses and should not exceed 6,000 words, excluding references.

- **Brief Communication**

Brief communications may be published more rapidly than original articles. They should be a short report of new research findings and should be no more than 2,000 words, excluding references. Summaries of short communications should not exceed 100 words.

## 4. PREPARING YOUR SUBMISSION

Manuscripts must be submitted as a Word or rtf file and should be written in English. The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

### Main Text File

Manuscripts can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. Should your manuscript reach revision stage, figures and tables must be provided as separate files. The main manuscript file can be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) or LaTeX (.tex) format.

If submitting your manuscript file in LaTeX format via Research Exchange, select the file designation “Main Document – LaTeX .tex File” on upload. When submitting a Latex Main Document, you must also provide a PDF version of the manuscript for Peer Review. Please upload this file as “Main Document - LaTeX PDF.” All supporting files that are referred to in the Latex Main Document should be uploaded as a “LaTeX Supplementary File.”

Your main document file should include:

- A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations
- The full names of the authors with institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author’s present address if different from where the work was conducted;
- Acknowledgments;
- Abstract;
- Up to six keywords;
- Main body: formatted as Summary and key words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest Statement
- References;
- Tables (each table complete with title and footnotes);
- Figures: Figure legends must be added beneath each individual image during upload AND as a complete list in the text.

### **Best Practices**

- The main manuscript file must be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) or LaTeX (.tex) formats.
- Figures should be numbered in the order that they are cited in the text, and presented in that order after the text of the paper
- Full names (First, Middle, and Last) should be provided for all authors
- Authors should include the complete affiliation addresses in the manuscript. At minimum, authors should include the institution name and country, but a complete affiliation also includes department name and institution city. The institution postal code is optional.

### **Title**

The title should be a short informative title that contains the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#)).

## Authorship

Please refer to the journal's authorship policy in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on eligibility for author listing.

## Acknowledgements

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgements section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

## Conflict of Interest Statement

You will be asked to disclose conflicts of interest during the submission process. See the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on what to include in this section. Please ensure that you liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement. The Conflict of Interest statement should be included within the main text file of your submission.

## Summary

Please provide a summary of no more than 250 words.

## Keywords

Please provide 3-6 keywords and list them in alphabetical order. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at <https://www.nlm.nih.gov/mesh/>.

## Main Text

Where possible, the text should be divided into the following sections: Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest Statement and References.

## References

### In-text Citations

The APA system of citing sources indicates the author's last name and the date, in parentheses within the text of the paper. Cite as follows:

**1. A typical citation of an entire work consists of the author's name and the year of publication.**

**Example:** Charlotte and Emily Bronte were polar opposites, not only in their personalities but in their sources of inspiration for writing (Taylor , 1990). Use the last name only in both first and subsequent citations, excepts when there is more than one author with the same

last name. In that case, use the last name and the first initial.

**2. If the author is named in the text, only the year is cited.**

*Example:* According to Irene Taylor (1990), the personalities of Charlotte.

**3. If both the name of the author and the date are used in the text, parenthetical reference is not necessary.**

*Example:* In a 1989 article, Gould explains Darwin's most successful.

**4. Specific citations of pages or chapters follow the year.**

*Example:* Emily Blonte "expressed increasing hostility for the world of human relationships, whether sexual or social" (Taylor, 1988, p. 11).

**5. When the reference is to a work by two authors, cite both names each time the reference appears.**

*Example:* Sexual-selection theory often has been used to explore patters of various insect matings (Alcock & Thornhill, 1983) . . . Alcock and Thornhill (1983) also demonstrate. . .

**6. When the reference is to a work by three to five authors, cite all the authors the first time the reference appears. In subsequent reference, use the first author's last name followed by <sup>ET AL</sup> (meaning "and others").**

*Example:* Patterns of byzantite intrigue have long plagued the internal politics of community college administration in Texas (Douglas <sup>ET AL</sup>, 1997). When the reference is to a work by six or more authors, use only the first author's name followed by <sup>ET AL</sup> in the first and all subsequent references. The only exceptions to this rule are when some confusion might result because of similar names or the same author being cited. In that case, cite enough authors so that the distinction is clear.

**7. When the reference is to work by a corporate author, use the name of the organization as the author.**

*Example:* Retired officers retain access to all of the university's educational and recreational facilities (Columbia University, 1987, p. 54).

**8. Personal letters, telephone calls, and the other material that cannot be retrieved are not listed in References but are cited in the text.**

*Example:* Jesse Moore (telephone conversation, April 17, 1989) confirmed that the ideas...

**9. Parenthetical references may mention more than one work, particularly when ideas have been summarized after drawing from several sources. Multiple citations should be arranged follows:**

*Examples:*

- List two or more works by the same author in order of the date of publication: (Gould, 1987, 1989)
- Differentiate works by the same author and write the same publication date by adding an identifying letter to each date: (Bloom, 1987a,1987b)
- List works by different author in alphabetical order by last name, and use semicolons to separate the references: (Gould, 1989; Smith, 1983; Tutwiler, 1989)

## References List

### APA - American Psychological Association

References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by the name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about the APA referencing style, please refer to the [APA FAQ](#). Please note that for journal articles issue numbers are not included unless each in the volume begins with page one.

### Journal article

Beers, S. R., & De Bellis, M.D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *THE AMERICAN JOURNAL OF PSYCHIATRY*, 159, 483-486. doi:[10.1176/appi.ajp.159.3.483](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483)

### Book edition

Bradley-Johnson, S. (1994). Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school (2nd ed.) Austin, TX: Pro-ed.

### Internet Document

Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from <http://www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs>

\*The Digital Object Identifier (DOI) is an identification system for intellectual property in the digital environment. Developed by the International DOI Foundation on behalf of the publishing industry, its goals are to provide a framework for managing intellectual content, link customers with publishers, facilitate electronic commerce, and enable automated copyright management.

### Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote

symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

### Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

### Preparing Figures

Although we encourage authors to send us the highest-quality figures possible, for peer-review purposes we are happy to accept a wide variety of formats, sizes, and resolutions.

[Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

### Guidelines for Cover Submission

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please [follow these general guidelines](#).

### Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

### Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article but that provides greater depth and background. It is hosted online, and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. [Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

### General Style Points

The following links provide general advice on formatting and style.

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website at <http://www.bipm.fr> for more information about SI units.
- **Trade Names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If

proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name, and the name and location of the manufacturer, in parentheses.

### **Wiley Author Resources**

Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

### **Article Preparation Support**

[Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

## **5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS**

### **Editorial Review and Acceptance**

The acceptance criteria for all papers is the quality and originality of the research and its significance to our readership. Except where otherwise stated, manuscripts are single-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements. Wiley's policy on confidentiality of the review process is available [here](#).

### **Data Sharing and Accessibility**

ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA recognizes the many benefits of archiving research data. The journal encourages you to archive all the data from which your published results are derived in a public repository. The repository that you choose should offer you guaranteed preservation (see the registry of research data repositories at <https://www.re3data.org/>) and should help you make it findable, accessible, interoperable, and re-useable, according to FAIR Data Principles (<https://www.force11.org/group/fairgroup/fairprinciples>). All accepted manuscripts are required to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. Authors will be required to confirm adherence to the policy. If you cannot share the data described in your manuscript, for example for legal or ethical reasons, or do not intend to share the data then you must provide the appropriate data availability statement. ANATOMIA HISTOLOGIA EMBRYOLOGIA notes that FAIR data sharing allows for access to shared data under restrictions (e.g., to protect confidential or proprietary information) but notes that the FAIR principles

encourage you to share data in ways that are as open as possible (but that can be as closed as necessary).

Sample statements are available [here](#). Please note that the samples provided are examples of how the statements can be formatted – these can be modified accordingly depending on your requirements. If published, all statements will be placed in the heading of your manuscript.

### **Data Citation**

Please also cite the data you have shared, like you would cite other sources that your article refers to, in your references section. You should follow the format for your data citations laid out in the Joint Declaration of Data Citation Principles, <https://www.force11.org/datacitationprinciples>:

[dataset] Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI)

### **Human Studies and Subjects**

For manuscripts reporting medical studies involving human participants, we require a statement identifying the ethics committee that approved the study, and that the study conforms to recognized standards, for example: standard patient consent form available.

### **Animal Studies**

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, and the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. We encourage authors to adhere to animal research reporting standards, for example the ARRIVE reporting guidelines for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines and regulations for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.
- UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).
- European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU.

### **Clinical Trial Registration**

We require that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Please include the name of the trial register and your clinical trial registration number at the end of your abstract. If your trial is not registered, or was registered retrospectively, please explain the reasons for this.



## Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. We encourage authors to adhere to the following research reporting standards.

- [STROBE](#)
- [National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines: the Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues](#)
- [Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities \(MIBBI\) website; Biosharing website](#)
- [REFLECT statement](#)

## Species Names

Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, the scientific name should be used only.

## Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see <http://varnomen.hgvs.org/>, where examples of acceptable nomenclature are provided.

## Nucleotide Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

DNA	Data	Bank	of	Japan	(DDBJ)	<a href="http://www.ddbj.nig.ac.jp">http://www.ddbj.nig.ac.jp</a>
EMBL		Nucleotide		Sequence	Submissions	<a href="http://www.ebi.ac.uk">http://www.ebi.ac.uk</a>
GenBank						<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>

## Conflict of Interest

ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to, patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or

receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships. The Conflict of Interest statement should be included within the main text file of your submission.

### **Funding**

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <http://www.crossref.org/fundingdata/registry.html>

### **Authorship**

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

- 1) Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
- 2) Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content;
- 3) Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
- 4) Agreed 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.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

### **Author Name Changes**

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

### **Correction to Authorship**

In accordance with [Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics](#) and the [Committee on Publication Ethics' guidance](#), ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the [Request for Changes to a Journal Article Author List Form](#) and contact either the journal's editorial or production office, depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in [Wiley's Best Practice Guidelines](#) under "Author name changes after publication."]

### Additional authorship options

Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

### ORCID

As part of our commitment to supporting authors at every step of the publishing process, ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. Find more [information](#).

### Publication Ethics

ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read our Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html>

## 6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [Open Access](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under Open Access, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click [here](#).)

**SELF-ARCHIVING DEFINITIONS AND POLICIES.** Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click here for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

**Open Access fees:** If you choose to publish using Open Access you will be charged a fee. To publish Open Access with ANATOMIA, HISTOLOGIA, EMBRYOLOGIA, the full Article Publication Charge is \$2,900 USD, £1,933 GBP or €2,417 EUR. A list of Article Publication Charges for all Wiley journals is available [here](#). For papers not published using Open Access there is no publication fee for papers.

**Funder Open Access:** Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

## 7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

### Accepted article received in production

When your accepted article is received by Wiley's production team, you (corresponding authors) will receive an email asking you to login or register with [Author Services](#). You will be asked to sign a publication licence at this point.

### First Look

After your paper is accepted, your files will be assessed by the editorial office to ensure they are ready for production. You may be contacted if any updates or final files are required. Otherwise, your paper will be sent to the production team.

### Proofs

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Page proofs should be carefully proofread for any copyediting or typesetting errors. Online guidelines are provided within the system. No special software is required, all common browsers are supported. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email. Return of proofs via e-mail is possible in the event that the online system cannot be used or accessed.

### Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before your article appears online, as Editors also need to review proofs. Once your article is published

on Early View no further changes to your article are possible. Your Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

**Cite Early View articles.** To link to an article from the author's homepage, take the DOI (digital object identifier) and append it to "http://dx.doi.org/" as per following examples: becomes, <https://doi.org/10.1111/ahe.12291>

## 8. POST PUBLICATION

### Article Promotion Support

[Wiley Editing Services](#) offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

### Access and sharing

When your article is published online:

- You receive an email alert (if requested).
- You can share your published article through social media.
- As the author, you retain free access (after accepting the Terms & Conditions of use, you can view your article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to your article.

Wiley also helps you measure the impact of your research through our specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

## 9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

[AHEoffice@wiley.com](mailto:AHEoffice@wiley.com)

AUTHOR GUIDELINES UPDATED 3RD MARCH 2021.