



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

**ANDRÉIA YURI YOSHIGAE**

**EXPOSIÇÃO PROLONGADA A UMA MISTURA DE DESREGULADORES  
ENDÓCRINOS INDUZ LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA  
DORSOLATERAL DE RATOS**

Presidente Prudente - SP  
2022



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

**ANDRÉIA YURI YOSHIGAE**

**EXPOSIÇÃO PROLONGADA A UMA MISTURA DE DESREGULADORES  
ENDÓCRINOS INDUZ LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA  
DORSOLATERAL DE RATOS**

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

Orientador: Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

636.089  
Y65e

Yoshigae, Andreia Yuri.

Exposição prolongada a uma mistura de desreguladores endócrinos induz lesões pré-neoplásicas na próstata dorsolateral de ratos / Andréia Yuri Yoshigae. – Presidente Prudente, 2022.

67f.: il.

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

Bibliografia.

Orientador: Leonardo de Oliveira Mendes.

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

**ANDRÉIA YURI YOSHIGAE**

**EXPOSIÇÃO PROLONGADA A UMA MISTURA DE DESREGULADORES  
ENDÓCRINOS INDUZ LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA  
DORSOLATERAL DE RATOS**

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

Presidente Prudente, 9 de novembro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Sérgio Alexandre Alcantara dos Santos  
Fox Chase Cancer Center, Temple University, USA  
Filadélfia-PA

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a todos envolvidos nesse projeto de pesquisa, à minha família e a Deus que me sustentou nos momentos de adversidades.

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao Dr. Leonardo de Oliveira Mendes que foi muito mais que um orientador, foi um amigo compassivo que compreendeu minhas limitações diante dos acontecimentos durante essa jornada.*

*A todos envolvidos nesse projeto que participaram da fase de bioterismo, coleta de dados e análises dos resultados. Às parceiras dessa pesquisa, Letícia, Karianne, Beatriz e especialmente a Maria Luiza e Thainá que sempre me ajudaram muito.*

*Ao coordenador do Mestrado em Ciência Animal Dr. Anthony Cesar de Souza Castilho e a vice-coordenadora Dra. Cecília Laposy Santarém pela compreensão diante dos fatos ocorridos na minha vida pessoal, permitindo a prorrogação do meu prazo.*

*À minha família, especialmente minha filha Luana e meu marido Elly, pela paciência com a minha falta de tempo.*

*À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº2018/24044-0) pelo apoio financeiro essencial para a realização dessa pesquisa.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

*“Jamais considere seus estudos como uma obrigação,  
mas como uma oportunidade invejável para aprender a  
conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito,  
para seu próprio prazer pessoal e para  
proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

### **Exposição prolongada à uma mistura de desreguladores endócrinos induz lesões pré-neoplásicas na próstata dorsolateral de ratos**

Desreguladores endócrinos (DE) são compostos químicos exógenos que podem desestabilizar a ação hormonal especialmente em órgãos hormônio-responsivos como a próstata. Vários efeitos adversos à saúde são relatados, como o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial prostática (PIN), aceita como principal lesão precursora de carcinoma prostático invasivo. A maioria das pesquisas envolvendo essas substâncias evidencia apenas a avaliação dos efeitos de DE isolados ou em pequenos grupos, durante curtos intervalos de exposição. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os aspectos histopatológicos da próstata dorsolateral de ratos expostos durante a gestação, lactação até a fase adulta a uma mistura de DE baseada na exposição ambiental. Vinte fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em 2 grupos experimentais (Ctrl e ED Mix) e expostas durante a gestação e lactação à uma mistura constituída de 12 compostos que incluem ftalatos, pesticidas, filtros u.v., além de bisfenol A e butilparabeno (diluídos em óleo de milho, por gavagem). Aos 22 dias de idade, os filhotes machos foram desmamados e continuaram a receber a mistura completa de DE até os 220 dias. Após a eutanásia, a próstata dorsolateral dos animais foi coletada, dissecada, pesada e destinada às análises: estereológica, morfométrica, fractal, histopatológica, kariométrica, quantificação de mastócitos e colágeno. Os resultados foram analisados por Teste T (paramétricos) expressos com média e desvio padrão e Teste Mann-Whitney (não paramétricos) expressos em mediana e intervalo interquartil com significância entre os grupos verificadas através do software Prism 5.0 (GraphPad), com valor de  $p < 0,05$ . A exposição à mistura de DE promoveu redução no peso absoluto da próstata e epidídimo, diminuição do compartimento estromal e aumento do compartimento luminal. A análise morfométrica revelou diminuição da altura epitelial no grupo ED Mix. As alterações observadas nas análises estereomorfológicas não foram evidenciadas pela análise fractal. A administração dos toxicantes ocasionou o recrutamento de células inflamatórias, displasia e em 80% dos animais o desenvolvimento de PIN. A análise kariométrica não revelou alteração no fenótipo nuclear entre os grupos. O número de mastócitos intactos e desgranulados foi superior nos animais do grupo ED Mix e em relação à identificação de colágeno, houve uma redução tanto no colágeno tipo I quanto no tipo III. Assim, concluímos que a mistura de DE num delineamento experimental baseado na exposição ambiental foi capaz de desestabilizar a histoarquitetura da próstata dorsolateral, predispondo este microambiente ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, além de redução do colágeno estromal.

**Palavras-chave:** disruptores endócrinos, exposição ambiental, neoplasia intraepitelial prostática, colágeno.



## ABSTRACT

### **Prolonged exposure to a mixture of endocrine disruptors induces preneoplastic lesions in the dorsolateral prostate of rats**

Endocrine disruptors (ED) are exogenous chemical compounds that can destabilize hormonal action especially in hormone-responsive organs such as the prostate, causing several adverse health effects such as the development of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), accepted as the main precursor lesion of invasive prostatic carcinoma. Most research involving these substances evidences only the evaluation of the effects of EDs alone or in small groups, during short exposure intervals. Therefore, the aim of the present study was to investigate the histological aspects of the dorsolateral prostate of rats exposed during pregnancy, lactation and adulthood to an ED mixture based on environmental exposure. Twenty pregnant females of the Sprague-Dawley strain were divided into 2 experimental groups (control and ED Mix) and exposed during pregnancy and lactation to a mixture consisting of 12 compounds that include phthalates, pesticides, u.v. filters, in addition to bisphenol A and butylparaben (diluted in corn oil by gavage). At 22 days of age, male pups were weaned and continued to receive the full DE mix until 220 days. After euthanasia, the dorsolateral prostate of the animals was collected, dissected and destined for analysis: biometric data, stereological, morphometric, fractal, histological, kariometric, mast cell quantification and collagen identification. The results were analyzed by the T Test (parametric) expressed as mean and standard deviation and Mann-Whitney Test (non-parametric) expressed as median and interquartile range with significance between the groups verified using the Prism 5.0 software (GraphPad), with p value < 0.05). Exposure to the mixture of DE promoted a reduction in the absolute weight of the prostate and epididymis, a decrease in the stromal compartment and an increase in the luminal compartment. The morphometric analysis revealed a decrease in epithelial height in the ED Mix group. The alterations observed in the stereo-morphometric analyzes were not evidenced by the fractal analysis. The administration of toxicants caused the appearance of inflammatory cells, dysplasia and in 80% of the animals the development of PIN. Kariometric analyzes did not reveal significant changes between groups. The number of intact and degranulated mast cells was higher in the animals of the ED Mix group and in relation to collagen identification there was a reduction in both type I and type III collagen. Thus, we conclude that the mixture of DE in an experimental design based on environmental exposure was able to destabilize the histoarchitecture of the dorsolateral prostate, predisposing this microenvironment to the development of pre-neoplastic lesions, inflammation, collagen reduction and morphological changes.

**Keywords:** endocrine disruptors, environmental exposure, prostatic intraepithelial neoplasia, inflammation, collagen.

## LISTA DE SIGLAS

AR	- Receptor andrógênio (Androgen receptor)
BPA	- Bisfenol A (Bisphenol A)
CaP	- Câncer de próstata (Prostate câncer)
DAG	- Distância anogenital (Anogenital distance)
DBP	- Di-n-butil ftalato (di-n-butyl phthalate)
DDE	- Diclorodifenil-dicloroetileno (Dichlorodiphenyl-dichloroethylene)
DE	- Desregulador endócrino (Endocrine disruptor)
DEHP	- Di-(2-etilexil) ftalato (di-(2-ethylhexyl) phthalate)
DG	- Dia gestacional (Gestational day)
DHT	- Dihidrotestosterona (Dihydrotestosterone)
DPN	- Dia pós-natal (Postnatal day)
E	- Estradiol
EE	- Estrógeno exógeno (Exogenous estrogen)
EPA	- Agência de Proteção Ambiental dos EUA (United States Environmental Protection Agency)
ER	- Receptor de estrogênio (Estrogen receptor)
HE	- Hematoxilina e eosina (Hematoxylin and eosin)
HGPIN	- Neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (High grade prostatic intraepithelial neoplasia)
LGPIN	- Neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (Low-grade prostatic intraepithelial neoplasia)
HPB	- Hiperplasia prostática benigna (Benign prostatic hyperplasia)
4-MBC	- 4-metil-benzidileno cânfora (4-methyl-benzylidene camphor)
MEC	- Matriz extracelular (Extracellular matrix)
OMC	- Metoxinamato de Octila (Octyl methoxycinnamate)
PDL	- Próstata dorsolateral (Dorsolateral prostate)
PIA	- Atrofia inflamatória proliferativa (Proliferative inflammatory atrophy)
PIN	- Neoplasia intraepitelial prostática (Prostatic intraepithelial neoplasia)
T	- Testosterona (Testosterone)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>12</b>
	<b>ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANINAIS (CEUA).....</b>	<b>43</b>
	<b>ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH.....</b>	<b>44</b>

# EXPOSIÇÃO PROLONGADA À UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS INDUZ LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA DORSOLATERAL DE RATOS

Andreia Yuri Yoshigae<sup>1</sup>, Maria Luiza Silva Ricardo<sup>1</sup>, Ana Beatriz Ratto Gorzoni<sup>1</sup>, Karianne Delalibera Hinokuma<sup>1</sup>, Thaina Cavalleri Sousa<sup>1</sup>, Letícia Pereira de Souza<sup>2</sup>, Ariana Musa de Aquino<sup>3</sup>, Wellerson Rodrigo Scarano<sup>3</sup>, Anthony César de Sousa Castillho<sup>1</sup>, Gisele Alborghetti Nai<sup>1,4</sup>, Leonardo de Oliveira Mendes<sup>1,4\*</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 Presidente Prudente – SP-Brasil;*

<sup>2</sup>*Faculty of Healthy Sciences, Western São Paulo University (UNOESTE), R. José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária, Presidente Prudente – SP, Brazil*

<sup>3</sup>*Department of Morphology, Bioscience Institute, IBB/UNESP, Rubião Junior, Botucatu-SP-Brazil*

<sup>4</sup>*Master Program in Health Science, Western São Paulo University (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro - Presidente Prudente – SP-Brazil*

\*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 ao qual será submetido: Environmental Science and Pollution Research, Fator de impacto: 5.190, Qualis: A2.

## 1 ARTIGO CIENTÍFICO

### EXPOSIÇÃO PROLONGADA À UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS INDUZ LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS NA PRÓSTATA DORSOLATERAL DE RATOS

Desreguladores endócrinos (DE) são compostos químicos exógenos que podem desestabilizar a ação hormonal especialmente em órgãos hormônio-responsivos como a próstata, causando vários efeitos, incluindo o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial prostática (PIN), aceita como principal lesão precursora de carcinoma prostático invasivo. A maioria das pesquisas envolvendo essas substâncias evidencia apenas a avaliação dos efeitos de DE isolados ou em pequenos grupos, durante curtos intervalos de exposição. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os aspectos histopatológicos da próstata dorsolateral de ratos expostos durante a gestação, lactação até a fase adulta à uma mistura de DE baseada na exposição ambiental. Vinte fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em 2 grupos experimentais (Ctrl e ED Mix) e expostas durante a gestação e lactação à uma mistura constituída de 12 compostos que incluem ftalatos, pesticidas, filtros u.v., além de bisfenol A e butilparabeno (diluídos em óleo de milho, por gavagem). Aos 22 dias de idade, os filhotes machos foram desmamados e continuaram a receber a mistura completa de DE até os 220 dias. Após a eutanásia, a próstata dorsolateral dos animais foi coletada, dissecada e destinada às análises: estereológica, morfométrica, fractal, histopatológica, kariométrica, quantificação de mastócitos e de colágeno. A exposição à mistura de DE promoveu a redução no peso absoluto da próstata e epidídimo, diminuição do compartimento estromal e aumento do compartimento luminal. A análise morfométrica revelou diminuição da altura epitelial no grupo ED Mix. As alterações observadas nas análises estereo-morfométricas não foram evidenciadas pela análise fractal. A administração dos toxicantes ocasionou o recrutamento de células inflamatórias, displasia e em 80% dos animais o desenvolvimento de PIN. A análise kariométrica não revelou alterações significativas no fenótipo nuclear. O número de mastócitos intactos e desgranulados foi superior nos animais do grupo ED Mix e em relação à quantificação de colágeno, houve uma redução tanto no colágeno tipo I quanto no tipo III. Assim, concluímos que a mistura de DE num delineamento experimental que mimetiza a exposição ambiental foi capaz de desestabilizar a histoarquitetura da próstata dorsolateral, predispondo este microambiente ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e redução do colágeno estromal.

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

## 50 1 INTRODUÇÃO

51

52 Alguns produtos químicos exógenos denominados Desreguladores Endócrinos (DE)  
53 podem desestabilizar o complexo sistema de comunicação entre os hormônios e suas células  
54 alvos, provocando efeitos adversos à saúde (La Merrill et al. 2020). De acordo com a Agência  
55 de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), DE é um agente exógeno que interfere na  
56 síntese, secreção, transporte, ligação ou eliminação de hormônios endógenos responsáveis  
57 pelo controle da homeostase (Kavlock et al. 1996; Zoeller et al. 2012). Caracterizam um  
58 grupo heterogêneo de substâncias que podem ser divididos em duas categorias: a. produzidos  
59 naturalmente por plantas e fungos (fitoestrógenos e micoestrógenos) b. produtos químicos  
60 sintetizados (plastificantes, fungicidas, herbicidas, fármacos, metais pesados, dioxinas, bifenil  
61 proclorado, polibromados, etc.) (Lymperi & Giwercman 2018; Kilcoyne & Mitchell 2019;  
62 Encarnação et al. 2019).

63 São elementos ubíquos presentes em alimentos, no ar, solo, cosméticos, na água,  
64 dispositivos eletrônicos, utensílios domésticos, entre outros, estando constantemente em  
65 contato com a população (Calaf et al. 2020; Kahn et al. 2020). São amplamente utilizados na  
66 agricultura e na indústria, contribuindo muito para a poluição ambiental e o período de sua  
67 decomposição pode durar muitas décadas (Yaglova et al. 2019). Sua onipresença em nosso  
68 ambiente cotidiano e sua meia-vida frequentemente longa representam intensa preocupação  
69 para a sociedade científica (Encarnação et al. 2019). Esses produtos químicos podem afetar a  
70 síntese, circulação, metabolismo e degradação hormonal, alterar o transporte transmembrana,  
71 a expressão de receptores celulares, perturbar a transdução de sinais e, além disso, também  
72 podem remodelar a epigenética das células, bloqueando ou impulsionando a migração,  
73 diferenciação, proliferação ou morte celular (Sweeney et al. 2015; Lacouture et al. 2021;  
74 Cunha et al. 2018; La Merrill et al. 2020).

75 A ação dos DE está relacionada principalmente a órgãos hormônio-responsivos como  
76 é o caso da próstata, glândula acessória essencial ao sistema reprodutor masculino (Motrich et  
77 al. 2018; Corti et al. 2022). As células luminais da próstata são dependentes de hormônios  
78 andrógenos, como testosterona (T) e 5 $\alpha$ -di-hidrotestosterona (DHT) que, conjuntamente com  
79 o estrógeno (E), atuam na proliferação e crescimento do órgão (Verze et al. 2016). Portanto,  
80 por se tratar de um órgão hormônio-dependente, a próstata está passível à ação dos DE nos  
81 processos de crescimento, diferenciação e manutenção da homeostase durante a maturidade  
82 (McPherson et al. 2008; Ellem & Risbridger 2010). Estudos revelaram que o desequilíbrio  
83 hormonal causado pela ação dos DE pode potencializar o desenvolvimento de distúrbios

84 como redução na fertilidade e peso dos órgãos, hiperplasia prostática benigna (HPB),  
85 prostatite, neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e câncer de próstata (CaP) (Schaeffer et al.  
86 2008; Prins et al. 2008; Biancardi et al. 2012; Wong et al. 2015; Barakat et al. 2017;  
87 Melching-Kollmuss et al. 2017; Bai et al. 2017)

88 A maior gama de estudos relacionados aos xenobióticos avalia a ação de DE  
89 isolados ou grupos específicos, distanciando-se da realidade ambiental que estamos inseridos  
90 (Rappaport & Smithm 2010). Silva et al (2002) sugerem que a exposição a vários produtos  
91 químicos em uma mistura, devido a efeitos sinérgicos ou aditivos, reproduz de forma mais  
92 fidedigna a nossa relação com as substâncias presentes no ambiente a que pertencemos (Silva  
93 et al. 2002; Hass et al. 2012; Patrick et al. 2016). Nesse contexto, Christiansen et al. (2012)  
94 estipularam uma mistura de treze compostos químicos selecionados como representativos de  
95 outros DE, constituído por oito substâncias que apresentam propriedades predominantemente  
96 anti-androgênicas e quatro compostos com propriedades predominantemente estrogênicas.  
97 Outro fator limitante na literatura científica acerca dos DE é o período de exposição, com  
98 estudos focados em períodos curtos e específicos da morfogênese com intervenções na fase  
99 intrauterina e neonatal. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar as repercussões  
100 histopatológicas na próstata dorsolateral decorrentes da exposição prolongada a uma mistura  
101 DE durante a gestação, lactação até a vida adulta.

102

## 103 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

104

### 105 **2.1 Animais e Ambiente de Experimentação**

106

107 Vinte e quatro fêmeas adultas (120 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) e  
108 doze machos adultos (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300g) da linhagem  
109 *Sprague-Dawley (SD)* foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica  
110 na Área de Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), e mantidos no Biotério  
111 de Pequenos Mamíferos da UNOESTE. Os animais foram distribuídos na proporção de duas a  
112 três fêmeas e um macho adulto para acasalamento por gaiola de polipropileno de  
113 41x34x16cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forrada com maravalha branca de  
114 pinho autoclavada, sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas 2 vezes por semana.  
115 Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério  
116 como: temperatura (média de 23°C a 25°C), umidade relativa do ar ( $55 \pm 10\%$ ), período de  
117 luz (12 horas claro/12 horas escuro), além da exaustão de ar contínua. Todos os animais

118 receberam ração comercial livre de fitoestrógenos (NUVILABCR1/Nuvital-PR) e água  
119 filtrada em bebedouros de vidro com tampa e bico metálicos com capacidade para 500 mL.  
120 Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os procedimentos de manuseio, administração de  
121 drogas, anestesia e eutanásia dos animais foram submetidas à Comissão de Ética no Uso de  
122 Animais da UNOESTE (Protocolo CEUA 6034).

123

## 124 **2.2 Mistura de DE**

125

126 Os compostos DBP (Cas nº 175606-05-0), DEHP (Cas nº 117-81-7), Vinclozin (Cas nº  
127 50-471-44-8), Procloraz (Cas nº 67747-09-5), Procimidona (Cas nº 32809-16- 8), Linuron  
128 (Cas nº 330-55-2), Epoxiconazol (Cas nº 133855-98-8), p,p'-DDE (Cas nº 72- 55-9), 4-MBC  
129 (Cas nº 36861-47-9), OMC (Cas nº 5466-77-3), BPA (Cas nº 80-05- 07) e Butilparabeno (Cas  
130 nº 94-26-8) foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EUA). A mistura de  
131 DE foi diluída em óleo de milho (veículo) na concentração de 32,11 mg/kg/dia e  
132 administrada por via oral (gavagem) nos animais durante o período gestacional, lactacional e  
133 vida adulta.

134

## 135 **2.3 Delineamento Experimental**

136

137 A presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e a citologia vaginal positiva da  
138 fase de estro foram consideradas indicadores do dia gestacional 0 (DG0). As fêmeas prenhes  
139 foram mantidas individualmente nas gaiolas e divididas aleatoriamente em 2 grupos  
140 experimentais (n=10/grupo): Grupo Ctrl: (veículo: óleo de milho, por gavagem); Grupo ED  
141 Mix: 32,11 mg/kg/dia da mistura de DE diluídos em óleo de milho (2 ml/kg) por gavagem. O  
142 número de fêmeas reduziu de vinte e quatro para vinte, pois quatro não ficaram prenhas. Os  
143 animais do grupo ED Mix receberam uma mistura de DE desenvolvida por Christiansen *et al.*  
144 (2012) e reproduzida por Axelstad *et al.* (2014), Isling *et al.* (2014), Boberg *et al.* (2015),  
145 Mandrup *et al.* (2015) e Johansson *et al.* (2016). A composição da mistura foi elaborada a  
146 partir do consumo humano ajustado e escolhido como base para estudo das misturas de cada  
147 DE e multiplicado por 100 devido ao metabolismo acelerado dos murinos. DBP (0,01), DEHP  
148 (0,02), vinclozin (0,009), procloraz (0,014), procimidona (0,015), linuron (0,0006),  
149 epoxiconazol (0,01), p,p'-DDE (0,001), 4-MBC (0,06), OMC (0,12), bisfenol A (0,0015) e  
150 butilparabeno (0,06), quando multiplicados por 100 formam uma mistura de 32,11mg/kg de  
151 peso corpóreo ao dia (Christiansen et al. 2012). Neste procedimento, a mistura de DE sofreu

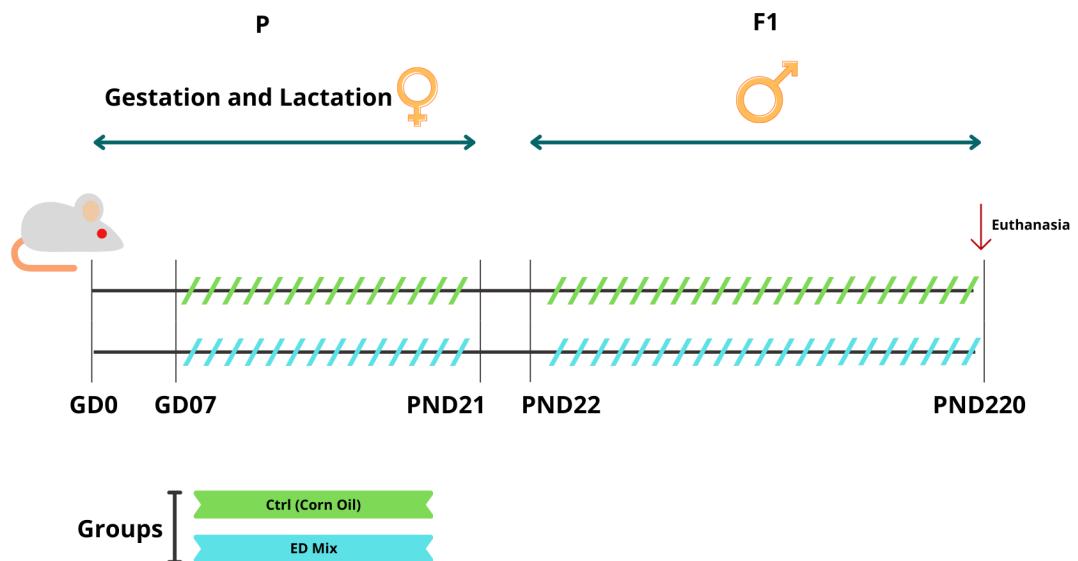


152 adaptação em relação à original, com consequente remoção do paracetamol da sua  
 153 composição, em virtude do potencial hepatotóxico que a droga possui, não sendo possível a  
 154 realização de uma exposição diária e prolongada.

155 As ratas prenhas ou lactentes receberam o tratamento do dia gestacional 7 (DG7) até  
 156 o dia pós-natal 21 (DPN21), sempre no mesmo período (8h – 10h). Todas foram mantidas em  
 157 gaiolas individuais e pesadas em dias alternados para permitir o cálculo do volume da mistura  
 158 de DE a ser administrado e a investigação de sinais clínicos de toxicidade.

159 Após o nascimento, houve a redução do número de filhotes por ninhada para 8  
 160 (proporção entre machos e fêmeas de 1:1), e ninhadas com número de filhotes inferior a sete  
 161 não foram utilizadas na pesquisa.

162 No DPN 22 foi feito o desmame dos filhotes machos, que ficaram alojados em caixas  
 163 contendo 3 animais cada. Os animais continuaram recebendo o tratamento com a mistura  
 164 completa de DE até os 220 dias de idade, quando foram eutanasiados por aplicação  
 165 intraperitoneal dos anestésicos cetamina e xilazina, seguido de exsanguinação. A próstata



166 dorsolateral foi removida, pesada e utilizada para as análises histológicas.

167 **Figura 1.** Representação esquemática do delineamento experimental. As linhas referem-se ao  
 168 período de exposição das ratas prenhas (GD07 a PND21) e da prole (PND22 a PND220)  
 169 a mistura de 12 DE. As linhas verdes representam a gavagem para o grupo exposto apenas ao  
 170 óleo de milho e linhas azuis para a exposição à mistura de DE. Período da eutanásia (seta  
 171 vermelha – PND220). GD (Gestational Day); PND (Postnatal Day).

172

173 **2.4 Análise dos dados biométricos**

174 Os ratos (10/grupo experimental) foram pesados no início e no final do tratamento  
175 para obtenção do ganho de peso corporal. Ao final do tratamento, a próstata ventral foi  
176 dissecada e pesada em balança analítica (Owa Labor, Oschatz, Alemanha).

177

## 178 **2.5 Análise da estrutura prostática**

179 Os fragmentos da próstata dorsolateral (PDL) foram rapidamente fixados por  
180 imersão em metacarn (6 metanol: 3 clorofórmio: 1 ácido acético) e mantidos em álcool 70%.  
181 Posteriormente, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol, clarificado em  
182 xilol e incluído em paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO, USA).

183 Os fragmentos incluídos em paraplast foram seccionados com 4µm de espessura em  
184 micrótomo rotativo e submetidos às seguintes colorações: Hematoxilina - Eosina (HE):  
185 (análise estereológica, altura do epitélio, análise da dimensão fractal, análise kariométrica e  
186 análise histopatológica), Azul de Toluidina: (quantificação de mastócitos) e Picrossirius:  
187 (identificação e quantificação de colágeno).

188

### 189 **2.5.1 Análise Estereológica**

190 A análise estereológica foi realizada em secções histológicas coradas com H.E de 10  
191 animais/grupo, sendo fotografados 10 campos histológicos/secção, aumento de 40x, e  
192 mensurada a proporção epitélio, lúmen e estroma através da Grade de Weibel, contendo 168  
193 pontos e 84 linhas, foi sobreposta à imagem histológica e, através do software contador de  
194 células, foi estimada a proporção ocupada pelos compartimentos (Weibel et al. 1978; Aquino  
195 et al. 2019)

196

### 197 **2.5.2 Análise da Altura do Epitélio**

198 A altura do epitélio do tecido prostático foi feita em secções histológicas coradas  
199 com H.E seguindo as instruções do software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados  
200 Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Foram  
201 analisadas secções histológicas de 10 animais/grupo, coradas com H.E, sendo fotografadas  
202 (10 campos histológicos/secção, aumento de 40x) e medidas 5 regiões distintas para cada foto  
203 (Aquino et al. 2019)

204

### 205 **2.5.3 Análise Fractal**

206 Para análise fractal foram utilizadas secções histológicas de 10 animais/grupo,  
207 coradas com HE, sendo fotografadas (10 campos histológicos/secção, aumento de 40x),

208 binarizadas para leitura e a dimensão fractal estimada pelo método box-counting, por meio do  
209 software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível  
210 gratuitamente na Internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). O software considerou o box-counting  
211 em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse espaço, não  
212 considerando, portanto, a textura da imagem. A influência disso é que duas imagens com a  
213 mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a mesma  
214 dimensão fractal.

215 A análise fractal das lâminas histológicas se baseou na relação entre a resolução e a  
216 escala avaliada, e o resultado fora quantitativamente expresso como a dimensão fractal do  
217 objeto que é  $DF = (\log Nr / \log r - 1)$ , sendo Nr a quantidade de elementos iguais necessários  
218 para preencher o objeto original e r a escala aplicada ao objeto. Com isso, a dimensão fractal  
219 foi calculada com o software Image J ficando sempre entre 0 e 2, não distinguindo texturas  
220 diferentes (Franchi et al. 2020).

221

#### 222 **2.5.4 Análise Histopatológica**

223 A análise histopatológica foi realizada por um único observador, cego e experiente,  
224 usando um microscópio óptico padrão (Nikon Labophot, Japão). Os parâmetros avaliados:  
225 inflamação, dilatação glandular, neoplasia intraepitelial prostática de baixo e alto grau e  
226 carcinoma in situ (10 animais/grupo).

227

#### 228 **2.5.5 Análise Kariométrica**

229 A análise kariométrica foi realizada em secções histológicas coradas com H.E de 10  
230 animais/grupo, sendo fotografado 4 campos histológicos/secção, aumento de 100x e realizada  
231 a medição de 5 regiões nucleares/fotografia aleatórias. Áreas de seção transversal nuclear  
232 ( $\mu\text{m}^2$ ) e perímetros ( $\mu\text{m}$ ) foram determinados para núcleos de 200 células secretoras epiteliais  
233 células para obter o fator de forma  $[=4\pi \cdot \text{área nuclear} / (\text{nuclear perímetro})^2]$  parâmetro. O  
234 parâmetro do fator de forma mede arredondamento e valores  $< 1$  estão associados a núcleos  
235 menos redondos, como estabelecido por Taboga *et al.* (2003).

236

#### 237 **2.5.6 Quantificação de Mastócitos**

238 A quantificação de mastócitos foi analisada através de secções histológicas de 10  
239 animais/grupo, coradas com azul de toluidina, sendo fotografados 20 campos  
240 histológicos/secção, aumento de 40x, com cada campo cobrindo uma área de  $0,085 \text{ mm}^2$ . O  
241 azul de toluidina permite a coloração metacromática dos grânulos citoplasmáticos presentes

242 nos mastócitos, graças à presença de heparina e outros glicosaminoglicano. Dessa forma,  
243 existe a possibilidade de observar uma diferenciação em mastócitos intactos e desgranulados  
244 por meio da ausência e/ou presença de grânulos metacromáticos no tecido conjuntivo  
245 circundante. (Mendes et al. 2014)

246

### 247 **2.5.7 Identificação e Quantificação de Colágeno**

248 As lâminas coradas com picrossirius foram analisadas utilizando luz polarizada, que  
249 diferencia os tipos de colágeno através da intensidade das fibras birrefringentes. Mais  
250 especificamente, a coloração avermelhada representa o colágeno tipo I e a cor esverdeada  
251 refere-se ao colágeno tipo III (Junqueira et al., 1978; Montes et al., 1980). Usando a  
252 ferramenta RGB *measure* do Image J, as fibras de colágeno foram diferenciadas e  
253 quantificadas. Este método mede separadamente os canais vermelho, verde e azul de uma  
254 imagem RGB (Image J, 2004). Portanto, em nosso estudo, nós utilizamos somente as  
255 quantificações para vermelho e verde, representando a porcentagem dos tipos de colágeno I e  
256 III, respectivamente.

257

### 258 **2.5.8 Análise Estatística**

259 Para analisar os dados, primeiramente foi verificada a normalidade pelo teste  
260 Shapiro-Wilk, o qual demonstrou a ocorrência de dados não-paramétricos para ganho de peso  
261 corpóreo, peso absoluto do epidídimo, peso relativo e absoluto do testículo, análise  
262 estereológica, altura do epitélio, análise kariométrica, quantificação de mastócitos e  
263 identificação de colágeno (teste de Mann-Whitney). Os valores para o peso relativo e  
264 absoluto da PDL, peso relativo do epidídimo e análise fractal foram considerados  
265 paramétricos (Teste T). Teste Binomial foi utilizado para a análise histopatológica. Todas as  
266 análises foram realizadas com auxílio do software Prism 5.0 (GraphPad), com significância de  
267  $p < 0,05$ .

268

## 269 **3 RESULTADOS**

270 A respeito dos dados biométricos, a exposição à mistura de DE promoveu a redução  
271 do peso absoluto da PDL e do epidídimo. Ganho de peso corpóreo, peso relativo da PDL e  
272 epidídimo e peso absoluto e relativo do testículo não apresentaram diferença entre os grupos.  
273 (Tabela 2)

274 A análise histopatológica revelou a presença de ácinos prostáticos com epitélio  
275 cúbico simples, com secreção luminal e um estroma com extensas fibras de colágeno nos

276 animais do grupo Ctrl (Figura 2A-C). Os animais do grupo ED Mix revelaram a presença de  
277 células inflamatórias intraluminais (Figura 2D) e desorganização epitelial, com alteração da  
278 morfologia celular e incidência de regiões displásicas (Figura 2E-F).

279 A figura 2G demonstra a análise estereológica, com redução do compartimento  
280 estromal, seguido de aumento do compartimento luminal nos animais que receberam a  
281 mistura de DE. Entretanto, apesar do compartimento epitelial não ter evidenciado alteração  
282 em sua proporção (Figura 2G), a análise morfométrica mostrou diminuição da altura do  
283 epitélio do grupo ED Mix, resultado característico de atrofia epitelial (Figura 2H). As  
284 alterações observadas nas análises estereo-morfométricas não foram evidenciadas pela análise  
285 fractal, que não verificou diferença no padrão de organização celular do microambiente  
286 prostático (Figura 2I).

287 Os animais do grupo Ctrl exibiram epitélio prostático normal composto por células  
288 cuboidais com núcleos basais e nucléolos diminutos. (Figura 3A-B). Em contrapartida o  
289 grupo ED Mix manifestou áreas com neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau  
290 (LGPIN) como mostram as Figuras 3C-D, com proliferação de células epiteliais, desarranjo  
291 arquitetural e variação do tamanho nuclear. Na figura 3D é possível observar a perda da  
292 polarização dos núcleos e presença de nucléolos aumentados. As figuras 3E-F revelam  
293 neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGPIN), demonstrando exuberante  
294 proliferação de células epiteliais secretoras com arranjo micropapilar. Nota-se a perda da  
295 polarização nuclear e presença de grandes nucléolos (3F). Essa discrepância fica explícita na  
296 Figura 3G, que indica que 80% dos animais expostos a mistura de DE apresentaram lesões do  
297 tipo PIN.

298 Referente à análise kariométrica, não houve alteração no padrão do fenótipo nuclear  
299 entre os grupos (Figura 4A-B). Em relação à quantificação de mastócitos, a administração da  
300 mistura de DE revelou maior número deste tipo celular, sendo este aumento tanto para a  
301 população de mastócitos intactos quanto desgranulados, sugerindo a existência de um intenso  
302 processo inflamatório nesses animais (Figura 4D).

303 No que concerne à identificação de colágeno, os animais que receberam a mistura de  
304 DE apresentaram diminuição significativa de colágeno tipo I e III (Figura 5C-D) em  
305 comparação ao grupo Ctrl, que ostentou densas fibras de colágeno (Figura 5A-B).

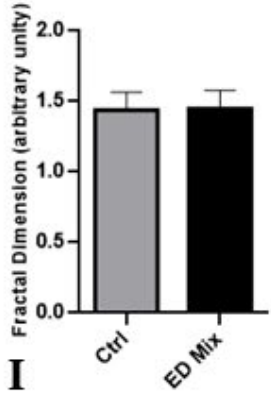
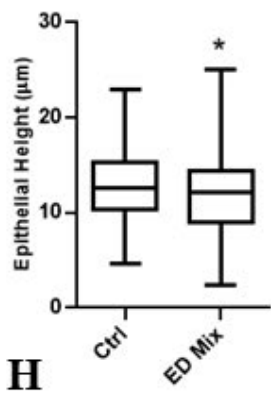
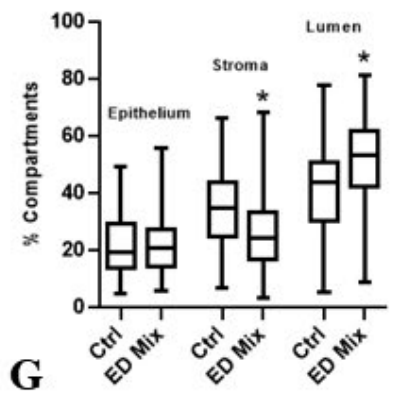
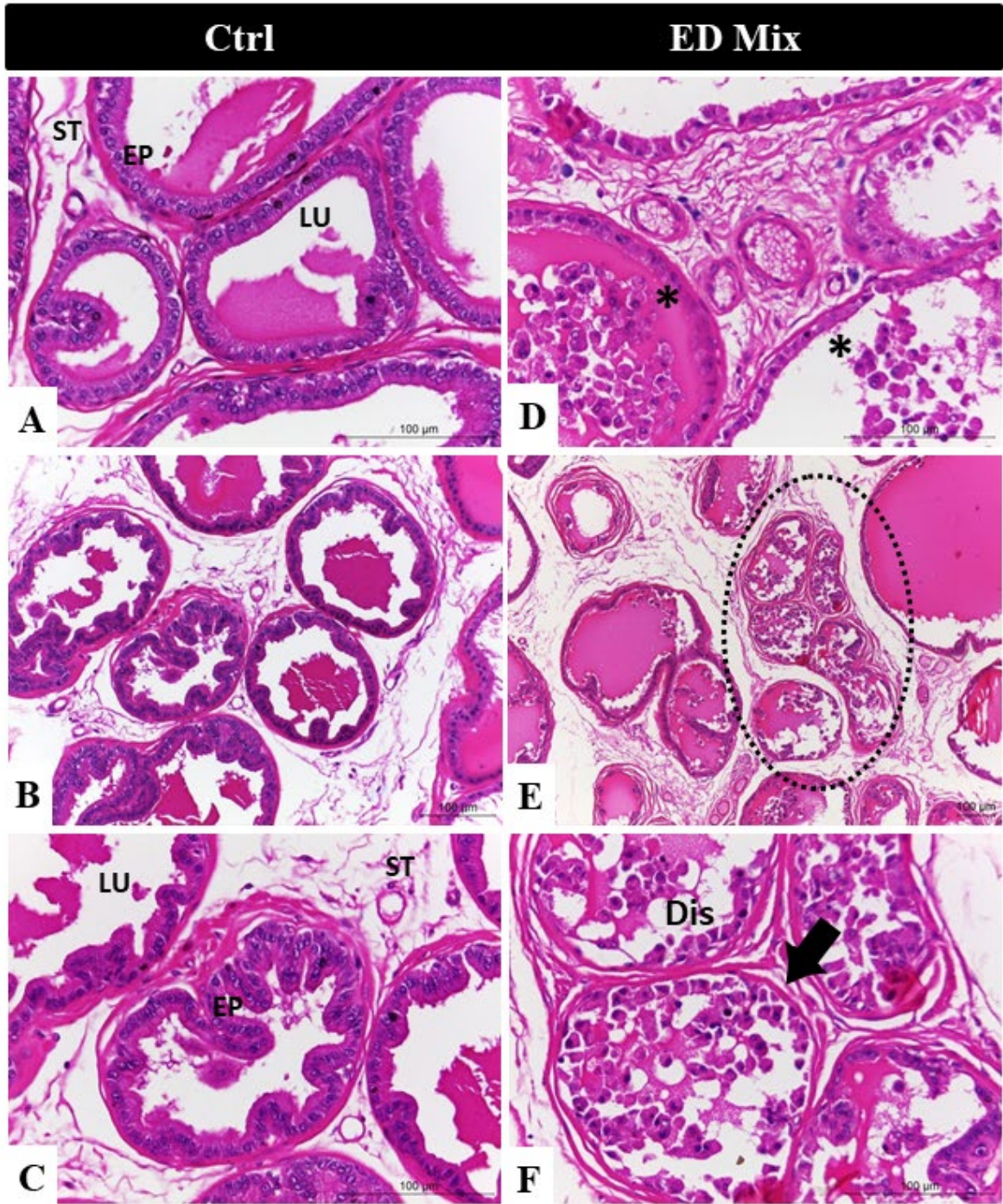
306

307

308 **Tabela 2.** Dados biométricos de ratos expostos prolongadamente à uma mistura de DE

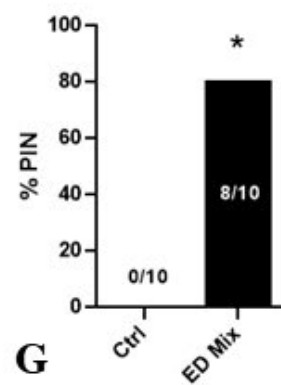
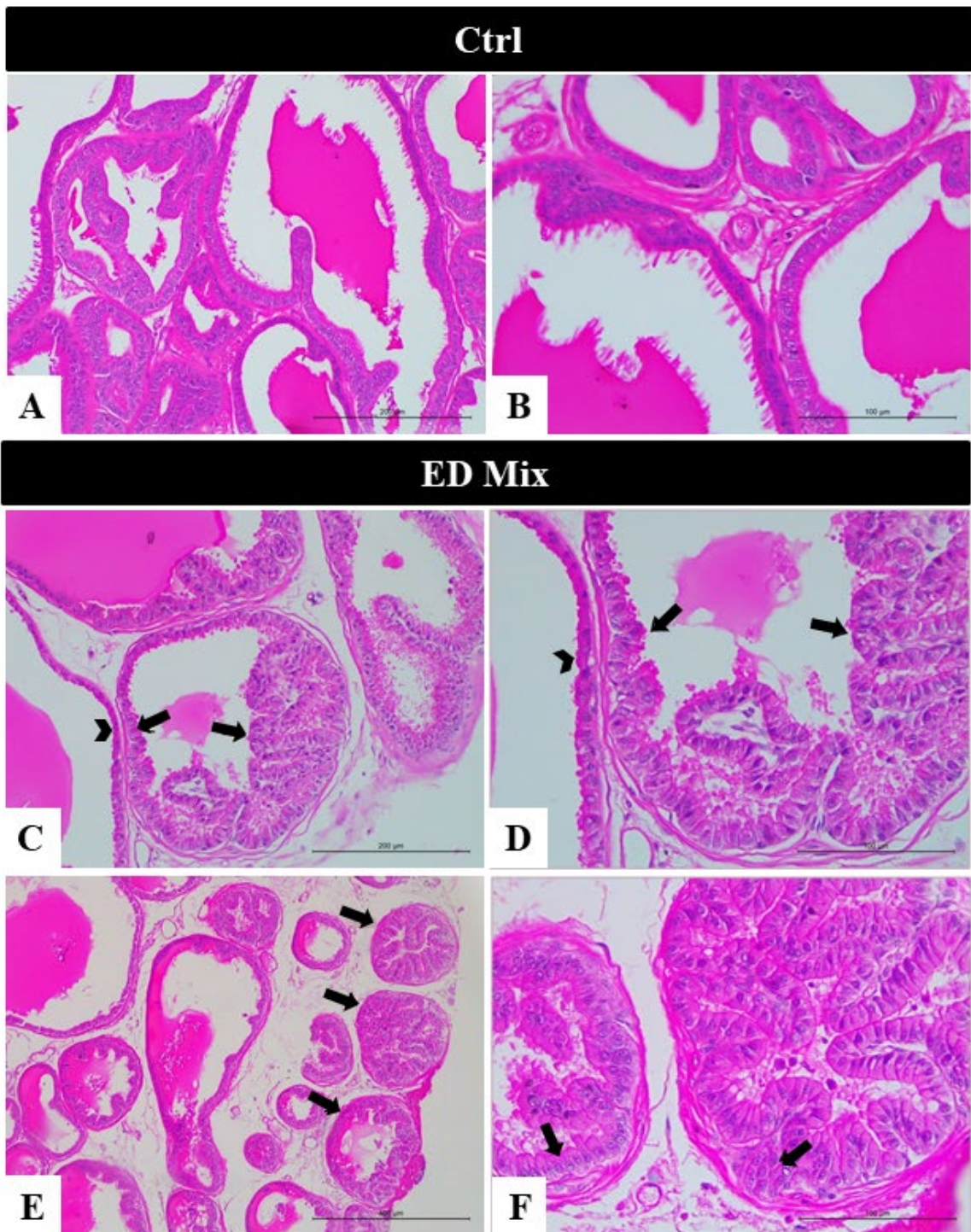
<b>Parameters</b>	<b>Ctrl</b>	<b>ED Mix</b>
Body Weight Gain	433.1 ± 57.65	431.8 ± 46.16
Relative Dorsolateral Prostate Weight	0.122 ± 0.017	0.115 ± 0.035
Absolute Dorsolateral Prostate Weight	0.614 ± 0.088	0.543 ± 0.127*
Relative Epididymis Weight	0.110 ± 0.013	0.108 ± 0.010
Absolute Epididymis Weight	0.560 (0.507;0.594)	0.543 (0.499;0.559)*
Relative Testis Weight (0.321;0.390)	0.323 (0.299;0.334)	0.339
Absolute Testis Weight (1.566;1.850)	1.616 (1.543;1.766)	1.667

309 Legenda: os valores de ganho de peso corpóreo, peso relativo e absoluto da PDL e peso  
310 relativo do epidídimo foram analisados pelo Teste T com dados expressos em média ± desvio  
311 padrão. O peso absoluto do epidídimo direito e peso relativo e absoluto do testículo direito  
312 foram analisados pelo Teste Mann-Whitney e expressos em mediana;intervalo interquartil.  
313 \*significância com valor de  $p < 0.05$  em relação ao grupo Ctrl. Pesos absolutos em g e relativos  
314 em g/100g de peso corporal.

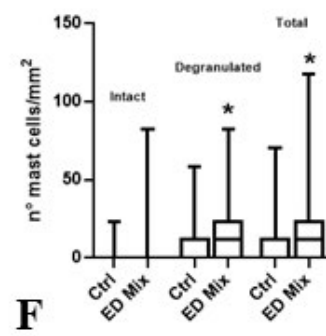
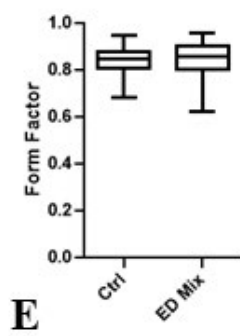
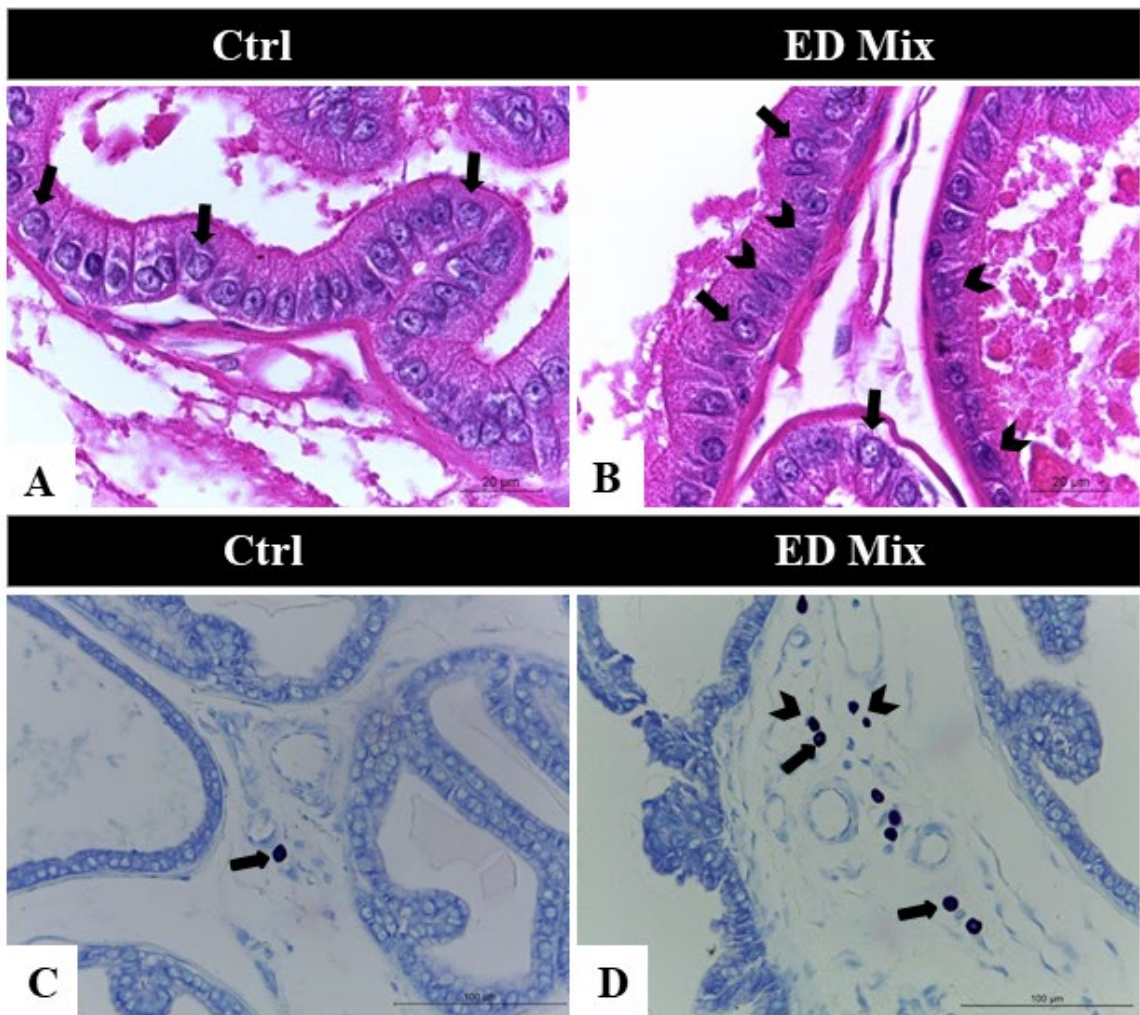


316 **Figura 2.** Secções histológicas da próstata dorsolateral de ratos expostos prolongadamente à  
317 uma mistura de DE. Coloração: HE. Grupo Ctrl (A, B e C), EP: epitélio; LU: lúmen; ST:  
318 estroma. Grupo ED Mix: (D) asteriscos indicando presença de células inflamatórias. (E e F)  
319 elipse e seta indicando desorganização epitelial e DIS: displasia. (G) representação gráfica da  
320 análise estereológica (10 animais/grupo, 10 campos histológicos/secção) (Teste Mann-  
321 Whitney, mediana; intervalo interquartil). (H) representação gráfica da análise morfométrica  
322 com n=10 animais/grupo, 10 campos histológicos/secção, revelando dados não paramétricos  
323 (Teste Mann-Whitney, mediana; intervalo interquartil). (I) representação gráfica da análise  
324 fractal (10 animais/grupo, 10 campos histológicos/secção), (Teste T, expressos em média ±  
325 desvio padrão). \*  $p < 0.05$  em relação ao grupo control.



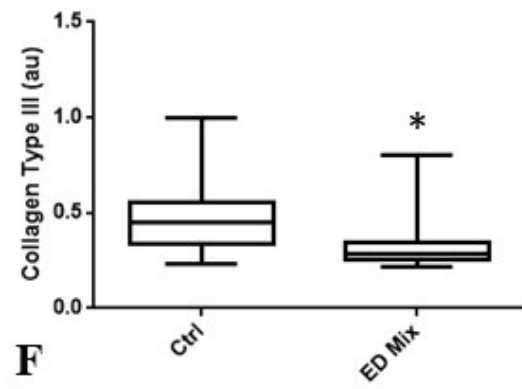
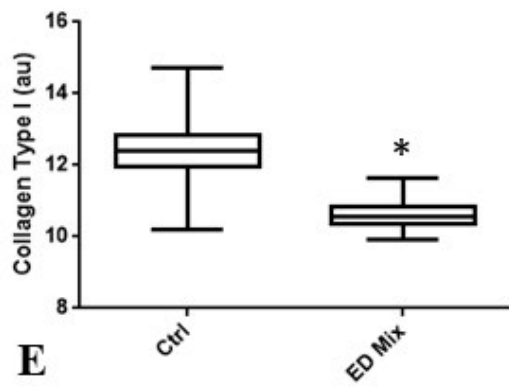
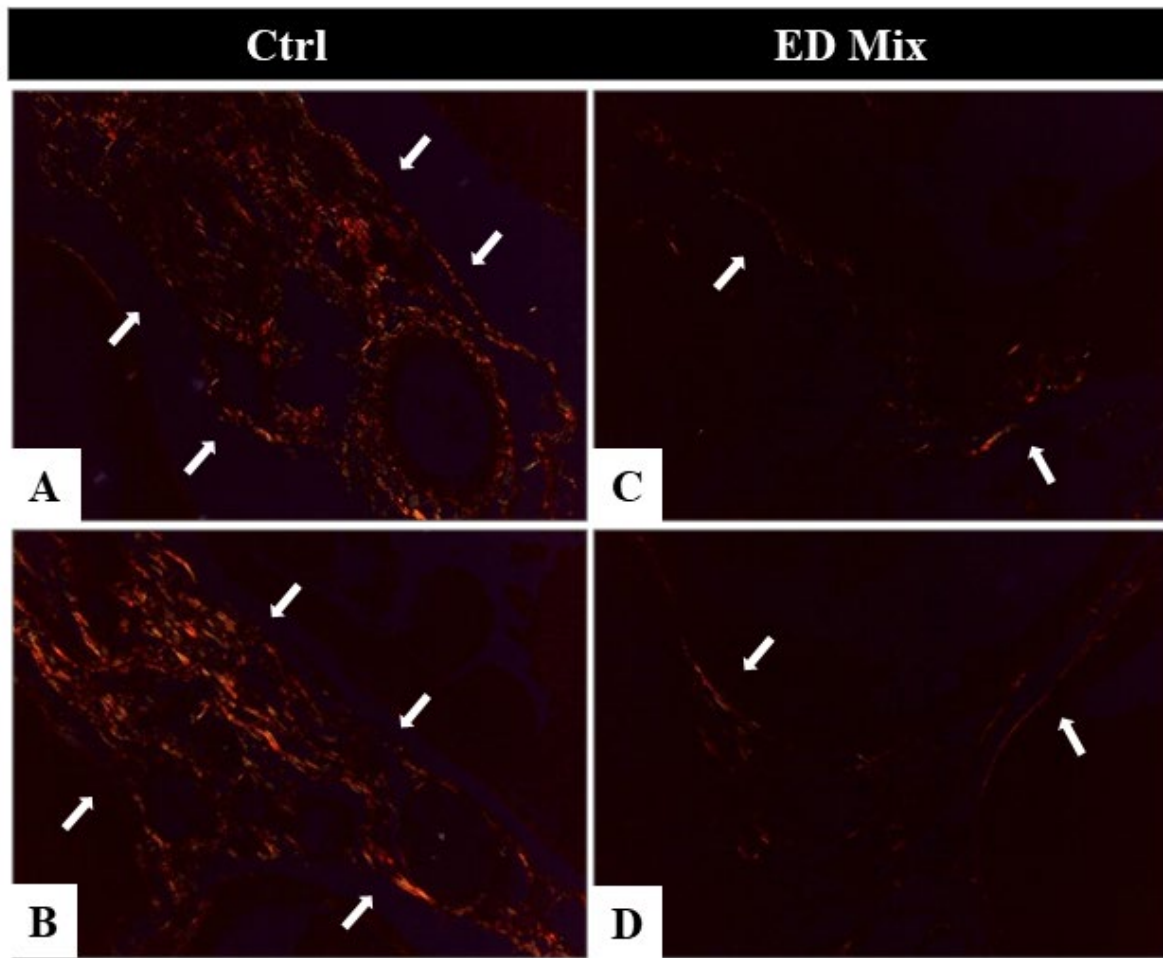


327 **Figura 3.** Secções histológicas da próstata dorsolateral de ratos expostos prolongadamente à  
328 uma mistura de DE. Coloração: HE. Grupo Control: (A e B) apresentando epitélio cúbico  
329 simples. Grupo ED Mix: (C e D) PIN de baixo grau, setas indicando proliferação de células  
330 epiteliais, desarranjo arquitetural e variação do tamanho nuclear. Cabeça de seta indicando  
331 epitélio normal. Na figura D setas apontam a perda da polarização dos núcleos e nucleolos  
332 evidentes. (E e F) PIN de alto grau, setas demonstrando exuberante proliferação de células  
333 epiteliais secretoras com arranjo micropapilar. Na imagem F as setas indicam perda da  
334 polarização nuclear e presença de grandes nucleolos. (G) representação gráfica do Teste  
335 Binomial com presença de 80% de neoplasia intraepitelial prostática no grupo ED Mix. \*  $p <$   
336 0.05 em relação ao grupo Ctrl.



337  
 338  
 339  
 340  
 341  
 342

343 **Figura 4.** Secções histológicas da próstata dorsolateral de ratos expostos prolongadamente à  
344 uma mistura de DE. Coloração: HE e azul de toluidina. (A) grupo Ctrl, setas indicam núcleos  
345 arredondados. (B) grupo ED Mix, setas indicando núcleos arredondados e cabeças de setas  
346 indicando núcleos disformes. (C) grupo Ctrl, seta indicando mastócito intacto. (D) grupo ED  
347 Mix, setas indicando mastócitos intactos e cabeças de setas indicando mastócitos  
348 desgranulados, caracterizados pela presença de grânulos no estroma prostático. (E)  
349 representação gráfica da análise kariométrica (10 animais/grupo, 4 campos  
350 histológicos/secção, medidas de 5 regiões nucleares) (Teste Mann-Whitney,  
351 mediana;intervalo interquartil). (F) representação gráfica da quantificação de mastócitos (10  
352 animais/grupo, 20 campos histológicos/secção), (Teste Mann-Whitney, mediana;intervalo  
353 interquartil). \*  $p < 0.05$  em relação ao grupo Ctrl.  
354  
355  
356



357

358

359

360

361

362

363

364 **Figura 5.** Secções histológicas da próstata dorsolateral de ratos expostos prolongadamente à  
365 uma mistura de DE. Coloração: Picrossirius. Grupo Ctrl: (A e B) setas indicando densas fibras  
366 de colágeno. Grupo ED Mix: (C e D) setas indicando discretas fibras de colágeno. (E)  
367 representação gráfica da quantificação de colágeno tipo I (10 animais/grupo, 10 campos  
368 histológicos/secção), (Teste Mann-Whitney, mediana;intervalo interquartil). (F) representação  
369 gráfica da quantificação de colágeno tipo III (Teste Mann-Whitney, mediana;intervalo  
370 interquartil). \*  $p < 0.05$  em relação ao grupo Ctrl.

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

#### 398 4 DISCUSSÃO

399

400 Salientando a onipresença de substâncias capazes de interferir no sistema hormonal e  
401 perturbar a homeostase fisiológica dos organismos que compõem a biosfera, o presente estudo  
402 avaliou a exposição a uma mistura de DE desde a gestação até a vida adulta, considerando  
403 importantes variáveis como combinação de diferentes compostos químicos e tempo de  
404 intervenção, visando aproximar a proposta da pesquisa à realidade da exposição humana.  
405 Nossos achados revelaram que 80% dos animais submetidos ao tratamento desenvolveram  
406 PIN, considerado o principal precursor de PCa invasivo. Corroborando a esse principal  
407 desfecho, a presença de inflamação, redução das fibras de colágeno, alteração entre os  
408 compartimentos prostáticos e atrofia epitelial fomentam evidências para um possível processo  
409 carcinogênico futuro. Além disso, é importante ressaltar que este é o primeiro estudo na  
410 literatura científica que utiliza um delineamento experimental que simula a exposição  
411 ambiental, aliando dose e período de exposição.

412 A ação dos DE ocorre através de um desequilíbrio hormonal, principalmente em  
413 hormônios esteroides. O equilíbrio entre hormônios andrógenos e estrógenos é essencial para  
414 o desenvolvimento adequado do sistema reprodutor masculino (Christiansen et al. 2012). A T  
415 promove o crescimento e diferenciação do epidídimo, vesícula seminal e ducto ejaculatório,  
416 enquanto seu metabólito mais ativo DHT atua na próstata, escroto, uretra e pênis.  
417 Concomitantemente, o E também desempenha papel importante nesse contexto (Verze et al.  
418 2016; Cooke et al. 2017; Corti et al. 2022). Os DE podem interferir em uma variedade de  
419 receptores celulares e alterar as respostas hormonais e metabólicas (Houston & Ghosh 2020).  
420 São capazes de interagir com os receptores AR, ER $\alpha$  e ER $\beta$  e desencadear diversas  
421 modificações genótípicas e, conseqüentemente, morfológicas no ambiente prostático  
422 (Lacouture et al. 2021), sendo estas últimas o foco do presente estudo.

423 Acerca dos dados biométricos, os pesos absolutos da PDL e epidídimo foram  
424 significativamente menores no grupo ED Mix. Possivelmente esse achado está relacionado  
425 com a ação antiandrogênica e estrogênica dos DE relatada em diversos estudos. A exposição  
426 ao DEHP durante a fase pré-natal é capaz de promover anormalidades no aparelho reprodutor  
427 masculino e senescência reprodutiva, visto que esse composto promove menor expressão  
428 mRNA de enzimas esteroidogênicas testiculares, reduzindo dessa forma a síntese de T fetal  
429 (Barakat et al. 2017; Martinez-Arguelles et al. 2009). Vários estudos comprovaram que altos  
430 níveis de EE estão relacionados à inibição do crescimento prostático, enquanto as baixas  
431 doses estimulam o crescimento e a função glandular (Vom Saal et al. 1997; Taylor et al.

432 2011). A administração de BPA em doses elevadas diminui a quantidade de hormônios  
433 esteroides, surprimindo o eixo hipotálamo-hipófise-gônadal e inibindo as enzimas 5 $\alpha$ -  
434 redutase, que converte T em DHT, e aromatase, que catalisa a conversão de andrógenos em  
435 estrógenos (Gonçalves et al. 2017; Sweeney et al. 2015). DHT é um potente estimulador de  
436 células estromais, induzindo a transcrição de fator de crescimento epidérmico, de  
437 queratinócitos e de fibroblastos e, portanto, a diminuição da sua expressão pode comprometer  
438 o crescimento da próstata (Taboga et al. 2009).

439       Através da análise esterológica foi possível verificar redução do compartimento  
440 estromal e aumento do compartimento luminal nos animais do grupo ED Mix. A diminuição  
441 do estroma prostático pode ser consequência da redução das fibras de colágeno, o maior  
442 constituinte não celular deste compartimento. O colágeno, uma proteína fibrilar produzida por  
443 fibroblastos, é o principal componente da matriz extracelular (MEC), com importância  
444 estrutural para o tecido, além de estar relacionado com a transcrição e tradução de genes  
445 associados à sinalização e ao metabolismo celular (Van Hoorde et al. 2000; Morrison et al.  
446 2000). Essa diminuição pode ter relação com a ativação de metaloproteinases que degradam  
447 colágeno, fibras reticulares, proteoglicanos e glicosaminoglicanos que compõem a MEC,  
448 disponibilizando fragmentos proteolíticos que podem se ligar a diversos receptores  
449 relacionados com proliferação, angiogênese e crescimento tumoral, como revisado por  
450 Gonçalves et al. (2015). Aumento de um dos principais tipos de metaproteinase envolvido na  
451 degradação de colágeno, o tipo 9, foi verificado na próstata de ratos adultos expostos durante  
452 o período gestacional e lactacional ao di-n-butil-ftalato (DBP). Os autores propõem que este  
453 aumento poderia estar correlacionado com a remodelação tecidual causada pelo processo  
454 inflamatório, que envolve a degradação de matriz extracelular, recrutamento de células e  
455 atrofia epitelial, eventos estes também observados no presente estudo (Scarano et al., 2009).

456       Embora não tenha ocorrido alteração na proporção ocupada pelo compartimento  
457 epitelial no microambiente prostático, a exposição à mistura de ED provocou redução da  
458 altura deste compartimento. De Marzo et al. (1999) relata que a atrofia difusa resulta de uma  
459 diminuição nos andrógenos circulantes e envolve toda a próstata de forma relativamente  
460 uniforme. Seguindo esta linha de raciocínio, Mendes et al. (2015) também observaram áreas  
461 de atrofia epitelial com redução na proporção ocupada por este compartimento na próstata de  
462 ratos submetidos ao consumo crônico de etanol. Os autores atribuem tais alterações ao menor  
463 volume citoplasmático das células epiteliais e, conseqüentemente, menor capacidade sintética,  
464 o que foi revertido após a terapia hormonal com testosterona, demonstrando a regulação  
465 hormonal sobre parâmetros morfológicos.



466 Apesar da análise fractal não ter verificado alteração no padrão de organização do  
467 microambiente prostático, esse método é valioso para a avaliação microscópica convencional,  
468 observando diferentes irregularidades e complexidades (Tambasco et al. 2009). Contudo, a  
469 literatura traz dados conflitantes em relação ao uso da análise fractal. De Arruda et al. (2013)  
470 demonstraram que a dimensão fractal aumenta de forma proporcional a agressividade de  
471 tumores e a desorganização tecidual na próstata. Já Pu et al. (2012) avaliaram maiores índices  
472 em tecidos prostáticos não tumorais. Assim, tornam-se necessários mais estudos que tenham  
473 como objetivo a validação do método fractal nas análises histopatológicas, sempre  
474 conciliando com análises já padronizadas.

475 Na análise histopatológica os animais que receberam a mistura de DE apresentaram  
476 células inflamatórias intraluminais, alteração da morfologia celular, incidência de regiões  
477 displásicas e apresentaram ácinos caracterizados pela presença de regiões com neoplasia  
478 intraepitelial prostática (PIN), lesão pré-neoplásica evidenciada pela presença de núcleos  
479 volumosos e nucléolos evidentes em 80% dos animais do grupo ED Mix. Autores acreditam  
480 que a etiologia da PIN esteja relacionada com uma condição denominada atrofia inflamatória  
481 proliferativa (PIA) caracterizada pela presença de atrofia epitelial e inflamação. A ação dos  
482 DE no desenvolvimento prostático em combinação com a injúria provocada pela inflamação  
483 promovem modificações na morfologia celular, adotando um fenótipo intermediário com  
484 propriedades de células epiteliais basais e luminais. A presença de PIA é considerada como  
485 uma transição de PIN e fator de risco para carcinogênese da próstata, pois expressam fatores  
486 semelhantes relacionados com aumento da proliferação e inibição da morte celular (Van  
487 Leenders et al. 2003; Putzi & De Marzo 2000; Nakayama et al. 2003; De Marzo et al. 2010).

488 Comprovando esses achados, De Jesus et al. (2015) observaram o desenvolvimento de  
489 lesões pré-malignas na próstata de ratos expostos ao DBP desde a gestação até a vida adulta,  
490 reforçando a ideia de que ação antiandrogênica deste composto pode afetar o  
491 desenvolvimento e a patogênese da próstata. Outros autores correlacionaram o surgimento de  
492 lesões prostáticas com a exposição ao BPA, composto que também compõe a mistura  
493 utilizada no presente estudo. Tais pesquisas revelam que animais que receberam BPA durante  
494 a vida adulta apresentaram maior incidência e maior número de lesões pré-malignas e  
495 malignas, além de maiores focos inflamatórios (Facina et al. 2018; Lam et al. 2016). Wang et  
496 al. (2017) avaliaram que a exposição uterina e lactacional ao ftalato DEHP produziu vários  
497 graus de lesão do tipo PIN, demonstrando que a fase pré e pós-natal são períodos críticos para  
498 os efeitos antiandrogênicos e estrogênicos no desenvolvimento da próstata.

499 Os resultados encontrados na análise kariométrica não revelam variação significativa

500 nos fenótipos nucleares entre os grupos experimentais. Os distúrbios nucleares como  
501 tamanho, forma, número de nucléolos e textura da cromatina são considerados indicadores de  
502 processos tumorais, entretanto determinar sua significância na progressão da doença ainda é  
503 um processo complexo. De acordo com Zink et al. (2004), tanto a redução quanto o aumento  
504 do tamanho do núcleo estão relacionados com a invasividade do câncer (Liddane et al. 2021).  
505 Um estudo envolvendo a exposição de ratos à um protocolo de indução à carcinogênese  
506 prostática constatou a presença de núcleos atípicos e de formato irregular no grupo onde  
507 houve apenas a indução de neoplasia prostática (Gonçalves et al. 2017). Corroborando com  
508 este achado, outras evidências apontam que as alterações nucleares detectadas pela análise  
509 kariométrica são mais frequentes em grupos que apresentam tumores malignos na próstata  
510 (Colanzi et al. 1999; Montironi et al. 2002; 2005). Diante disso, a ausência de irregularidade  
511 nuclear obtida no presente estudo pode ser resultado da inexistência de um processo  
512 carcinogênico já estabelecido, diferente dos exemplos citados anteriormente.

513 A presença de células inflamatórias na próstata é característica comum de  
514 desregulação endócrina por produtos químicos estrogênicos e antiandrogênicos (Stoker et al.  
515 1999). Cowin et al. (2008) avaliaram que a exposição intrauterina ao Vinclozolin provocou  
516 resposta inflamatória nos lobos prostáticos de ratos adultos, com evidências significativas da  
517 interação entre as vias de sinalização do AR e NF $\kappa$ B (do inglês- nuclear fator kappa B), que  
518 ativa genes pró-inflamatórios que codificam citocinas como TGF- $\beta$  (fator de crescimento  
519 transformador beta) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), quimiocinas IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-8  
520 (interleucinas) e receptores toll-like TLR1, TLR6, TLR9 e TNF. O BPA também se mostrou  
521 responsável pela ativação deste fator inflamatório em culturas de células microgлияis pela  
522 ativação de vias celulares como MAPK (quinase proteica ativada por mitógenos) e NF $\kappa$  $\beta$  que  
523 induzem o recrutamento de células imunológicas, incluindo os mastócitos (Zhu et al. 2015;  
524 Murata & Kang 2018).

525 Os mastócitos são células do sistema imune que estão fortemente associadas a  
526 processos inflamatórios (Wasiuk et al. 2009). Bankl et al. (2001) demonstraram que na  
527 hiperplasia prostática ocorre um aumento do número de mastócitos, contribuindo para a  
528 inflamação crônica, conhecida como prostatite. A contribuição da exposição aos DE para o  
529 aumento do número de mastócitos é pouco elucidada na literatura. Os primeiros estudos  
530 evidenciam um aumento do número de mastócitos nos testículos de ratos expostos ao  
531 estrogênio no período neonatal (Gaytan et al. 1989). Diante disso, o aumento do número de  
532 mastócitos indica intenso processo inflamatório, bem como precede o surgimento de doenças  
533 crônicas, pois estas células iniciam o recrutamento de outros tipos celulares envolvidos na

534 resposta imune e a relação com a carcinogênese reside na liberação de espécies reativas de  
535 oxigênio e nitrogênio que promovem danos no DNA, instabilidade genética e estimulam a  
536 proliferação de células epiteliais (Fibbi et al. 2009).

537 Como supracitado, a exposição à DE, que perturbam a homeostase prostática,  
538 causando transtornos saúde, é tão onipresente que se torna difícil imaginar uma maneira de  
539 eliminar essa ameaça em potencial. É de suma importância que mais estudos nesse contexto  
540 sejam realizados e, principalmente, que pesquisas experimentais se tornem translacionais,  
541 para servir de base para o fomento de políticas públicas e legislações que busquem reduzir a  
542 utilização dos DE e desenvolvam tecnologias que minimizem os danos causados por esses  
543 produtos no meio ambiente e na saúde humana e animal.

544

## 545 **5. CONCLUSÃO**

546 A partir dos dados apresentados neste estudo, podemos concluir que a exposição a  
547 uma mistura de DE ao longo da vida promove diversas alterações histopatológicas na próstata  
548 dorsolateral, que incluem redução no peso absoluto da PDL e epidídimo, diminuição do  
549 compartimento estromal e aumento do compartimento luminal, atrofia epitelial, elevação do  
550 número de mastócitos , caracterizando um processo inflamatório, redução das fibras de  
551 colágeno tipo I e tipo III e presença de lesões PIN, podendo culminar com o  
552 desenvolvimento de lesões neoplásicas a longo prazo.

553

## 554 **6. REFERÊNCIAS**

555

556 Aquino AM, Salata GC, Pinho CF, de Freitas ATAG, Périco LL, de Lion Siervo GEM,  
557 Mendes LO, Medeiros PC, Justulin LA, Fernandes GSA, Perobelli JE, Scarano WR (2019)  
558 Arsenic exposure during prepuberty alters prostate maturation in pubescent rats. *Reprod*  
559 *Toxicol* 89:136-144. doi: 10.1016/j.reprotox.2019.07.010

560

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

564

565 Bai J, Han H, Wang F, Su L, Ding H, Hu X, Hu B, Li H, Zheng W, Li Y (2017) Maternal  
566 linuron exposure alters testicular development in male offspring rats at the whole genome  
567 level. *Toxicology* 389:13-20. doi: 10.1016/j.tox.2017.07.005

568

- 569 Bankl HC, Samorapoompichit P, Pikula B, Latinovic L, Bankl H, Lechner K, Valent P (2001)  
570 Characterization of human prostate mast cells and their increase in periprostatic vein  
571 thrombosis. *Am J Clin Pathol* 116(1):97-106. doi: 10.1309/C0TP-MA3M-K5FX-3Q2F  
572
- 573 Barakat R, Lin PP, Rattan S, Brehm E, Canisso IF, Abosalum ME, Flaws JA, Hess R, Ko C  
574 (2017) Prenatal Exposure to DEHP Induces Premature Reproductive Senescence in Male  
575 Mice. *Toxicol Sci* 156(1):96-108. doi: 10.1093/toxsci/kfw248  
576
- 577 Biancardi MF, Perez AP, Góes RM, Santos FC, Vilamaior PS, Taboga SR (2012) Prenatal  
578 testosterone exposure as a model for the study of endocrine-disrupting chemicals on the gerbil  
579 prostate. *Exp Biol Med (Maywood)* 237(11):1298-309. doi: 10.1258/ebm.2012.012051  
580
- 581 Boberg J, Johansson HK, Hadrup N, Dreisig K, Berthelsen L, Almstrup K, Vinggaard AM,  
582 Hass U (2015) Perinatal exposure to mixtures of anti-androgenic chemicals causes  
583 proliferative lesions in rat prostate. *Prostate* 75(2):126-40. doi: 10.1002/pros.22897  
584
- 585 Calaf GM, Ponce-Cusi R, Aguayo F, Muñoz JP, Bleak TC (2020) Endocrine disruptors from  
586 the environment affecting breast cancer. *Oncol Lett* 20(1):19-32. doi: 10.3892/ol.2020.11566  
587
- 588 Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, Faust M,  
589 Lichtensteiger W, Schlumpf M, Burdorf A, Hass U (2012) Mixtures of endocrine disrupting  
590 contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J*  
591 *Androl* 35(3):303-16. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01242.x  
592
- 593 Colanzi P, Santinelli A, Mazzucchelli R, Pomante R, Montironi R (1999) Changes in the  
594 normal-looking epithelium in prostates with PIN or cancer. *Adv Clin Path* 3(4):129-34.  
595 PMID: 10936890.  
596
- 597 Cooke PS, Nanjappa MK, Ko C, Prins GS, Hess RA (2017) Estrogens in Male Physiology.  
598 *Physiol Ver* 1;97(3):995-1043. doi: 10.1152/physrev.00018.2016  
599
- 600 Corti M, Lorenzetti S, Ubaldi A, Zilli R, Marcoccia D (2022) Endocrine Disruptors and  
601 Prostate Cancer. *Int J Mol Sci* 23(3):1216. doi: 10.3390/ijms23031216  
602
- 603 Cowin PA, Foster P, Pedersen J, Hedwards S, McPherson SJ, Risbridger GP (2008) Early-  
604 onset endocrine disruptor-induced prostatitis in the rat. *Environ Health Perspect* 116(7):923-9.  
605 doi: 10.1289/ehp.1123  
606
- 607 Cunha GR, Vezina CM, Isaacson D, Ricke WA, Timms BG, Cao M, Franco O, Baskin LS  
608 (2018) Development of the human prostate. *Differentiation* 103:24-45. doi:  
609 10.1016/j.diff.2018.08.005  
610
- 611 De Arruda PF, Gatti M, Facio FN Jr, de Arruda JG, Moreira RD, Murta LO Jr, de Arruda LF,  
612 de Godoy MF (2013) Quantification of fractal dimension and Shannon's entropy in

- 613 histological diagnosis of prostate cancer. *BMC Clin Pathol* 18;13:6. doi: 10.1186/1472-6890-  
614 13-6
- 615
- 616 De Jesus MM, Negrin AC, Taboga SR, Pinto-Fochi ME, Góes RM (2015) Histopathological  
617 alterations in the prostates of Mongolian gerbils exposed to a high-fat diet and di-n-butyl  
618 phthalate individually or in combination. *Reprod Toxicol* 52:26-39. doi:  
619 10.1016/j.reprotox.2015.02.005
- 620
- 621 De Marzo AM, Nelson WG, Bieberich CJ, Yegnasubramanian S (2010) Prostate cancer: New  
622 answers prompt new questions regarding cell of origin. *Nat Rev Urol* 7(12):650-2. doi:  
623 10.1038/nrurol.2010.188
- 624
- 625 Ellem SJ, Risbridger GP (2010) Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the  
626 prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118:246-51. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.10.015
- 627
- 628 Encarnação T, Pais AA, Campos MG, Burrows HD (2019) Endocrine disrupting chemicals:  
629 Impact on human health, wildlife and the environment. *Sci Prog* 102(1):3-42. doi:  
630 10.1177/0036850419826802
- 631
- 632 Facina CH, Campos SGP, Gonçalves BF, Góes RM, Vilamaior PSL, Taboga SR (2018)  
633 Long-term oral exposure to safe dose of bisphenol A in association with high-fat diet  
634 stimulate the prostatic lesions in a rodent model for prostate cancer. *Prostate* 78(2):152-163.  
635 doi: 10.1002/pros.23458
- 636
- 637 Fibbi B, Penna G, Morelli A, Adorini L, Maggi M (2010) Chronic inflammation in the  
638 pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Int J Androl* 33(3):475-88. doi: 10.1111/j.1365-  
639 2605.2009.00972.x
- 640
- 641 Franchi FF, Hernandez MP, Ferreira ALC, de Lima VAV, Mendes LO, Aquino AM, Scarano  
642 WR, Castilho ACS (2020) Fractal analysis and histomolecular phenotyping provides insights  
643 into extracellular matrix remodeling in the developing bovine fetal ovary. *Biochem Biophys*  
644 *Res Commun* 523(4):823-828. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.025
- 645
- 646 Gaytan F, Carrera G, Pinilla L, Aguilar R, Bellido C (1989) Mast cells in the testis,  
647 epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *J Androl*  
648 10(5):351-8. doi: 10.1002/j.1939-4640.1989.tb00117.x
- 649
- 650 Gonçalves BF, Campos SG, Costa CF, Scarano WR, Góes RM, Taboga SR (2015) Key  
651 participants of the tumor microenvironment of the prostate: an approach of the structural  
652 dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal  
653 transition. *Acta Histochem* 117(1):4-13. doi: 10.1016/j.acthis.2014.10.009
- 654
- 655 Gonçalves BF, de Campos SGP, Góes RM, Scarano WR, Taboga SR, Vilamaior PSL (2017)  
656 Dual action of high estradiol doses on MNU-induced prostate neoplasms in a rodent model  
657 with high serum testosterone: Protective effect and emergence of unstable epithelial  
658 microenvironment. *Prostate* 77(9):970-983. doi: 10.1002/pros.23353

659

660 Hass U, Boberg J, Christiansen S, Jacobsen PR, Vinggaard AM, Taxvig C, Poulsen ME,  
661 Herrmann SS, Jensen BH, Petersen A, Clemmensen LH, Axelstad M (2012) Adverse effects  
662 on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine  
663 disrupting pesticides. *Reprod Toxicol* 34(2):261-74. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.05.090

664

665 Houston TJ, Ghosh R (2020) Untangling the association between environmental endocrine  
666 disruptive chemicals and the etiology of male genitourinary cancers. *Biochem Pharmacol*  
667 172:113743. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113743

668

669 Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, Mandrup KR, Axelstad M, Christiansen S, Vinggaard AM,  
670 Taxvig C, Kortenkamp A, Hass U (2014) Late-life effects on rat reproductive system after  
671 developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters. *Reproduction* 147(4):465-76.  
672 doi: 10.1530/REP-13-0448

673

674 Johansson HK, Jacobsen PR, Hass U, Svingen T, Vinggaard AM, Isling LK, Axelstad M,  
675 Christiansen S, Boberg J (2016) Perinatal exposure to mixtures of endocrine disrupting  
676 chemicals reduces female rat follicle reserves and accelerates reproductive aging. *Reprod*  
677 *Toxicol* 61:186-94. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.03.045

678

679 Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R (1978) Differential staining of collagens type I, II  
680 and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 41(3):267-74. doi:  
681 10.1679/aohc1950.41.267

682

683 Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L (2020) Endocrine-disrupting  
684 chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8(8):703-718. doi:  
685 10.1016/S2213-8587(20)30129-7

686

687 Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M,  
688 Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson  
689 HÁ (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of  
690 endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*  
691 104 Suppl 4(Suppl 4):715-40. doi: 10.1289/ehp.96104s4715

692

693 Kilcoyne KR, Mitchell RT(2019) Effect of environmental and pharmaceutical exposures on  
694 fetal testis development and function: a systematic review of human experimental data. *Hum*  
695 *Reprod Update* 25(4):397-421. doi: 10.1093/humupd/dmz004

696

697 Lacouture A, Lafront C, Peillex C, Pelletier M, Audet-Walsh É (2021) Impacts of endocrine-  
698 disrupting chemicals on prostate function and cancer. *Environ Res* 204:112085. doi:  
699 10.1016/j.envres.2021.112085

700

701 La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, Guyton  
702 KZ, Kortenkamp A, Coglianò VJ, Woodruff TJ, Rieswijk L, Sone H, Korach KS, Gore AC,

- 703 Zeise L, Zoeller RT (2020) Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting  
704 chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol* 16(1):45-57. doi:  
705 10.1038/s41574-019-0273-8  
706
- 707 Lam HM, Ho SM, Chen J, Medvedovic M, Tam NN (2016) Bisphenol A Disrupts HNF4 $\alpha$ -  
708 Regulated Gene Networks Linking to Prostate Preneoplasia and Immune Disruption in Noble  
709 Rats. *Endocrinology* 157(1):207-19. doi: 10.1210/en.2015-1363  
710
- 711 Liddane AG, McNamara CA, Campbell MC, Mercier I, Holaska JM (2021) Defects in  
712 Emerin-Nucleoskeleton Binding Disrupt Nuclear Structure and Promote Breast Cancer Cell  
713 Motility and Metastasis. *Mol Cancer Res* 19(7):1196-1207. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-  
714 0413  
715
- 716 Lymperi S, Giwercman A (2018) Endocrine disruptors and testicular function. *Metabolism*  
717 86:79-90. doi: 10.1016/j.metabol.2018.03.022  
718
- 719 Mandrup KR, Johansson HK, Boberg J, Pedersen AS, Mortensen MS, Jørgensen JS,  
720 Vinggaard AM, Hass U (2015) Mixtures of environmentally relevant endocrine disrupting  
721 chemicals affect mammary gland development in female and male rats. *Reprod Toxicol*  
722 54:47-57. doi: 10.1016/j.reprotox.2014.09.016  
723
- 724 Martinez-Arguelles DB, Culty M, Zirkin BR, Papadopoulos V. In utero exposure to di-(2-  
725 ethylhexyl) phthalate decreases mineralocorticoid receptor expression in the adult testis.  
726 *Endocrinology*. 2009 Dec;150(12):5575-85. doi: 10.1210/en.2009-0847  
727
- 728 McPherson SJ, Ellem SJ, Risbridger GP (2008) Estrogen-regulated development and  
729 differentiation of the prostate. *Differentiation* 76:660-70. doi: 10.1111/j.1432-  
730 0436.2008.00291.x  
731
- 732 Melching-Kollmuss S, Fussell KC, Schneider S, Buesen R, Groeters S, Strauss V, van  
733 Ravenzwaay B (2017) Comparing effect levels of regulatory studies with endpoints derived in  
734 targeted anti-androgenic studies: example prochloraz. *Arch Toxicol* 91(1):143-162. doi:  
735 10.1007/s00204-016-1678-y  
736
- 737 Mendes LO, Scarano WR, Rochel-Maia SS, Fioruci-Fontaneli BA, Chuffa LG, Anselmo-  
738 Franci JA, Martinez FE (2015) Androgen therapy reverses injuries caused  
739 by ethanol consumption in the prostate: testosterone as a possible target to ethanol-related  
740 disorders. *Life Sci* 120:22-30. doi: 10.1016/j.lfs.2014.11.003
- 741 Mendes LO, Scarano WR, Rochel-Maia SS, Fioruci-Fontaneli BA, Chuffa LG, Martinez FE  
742 (2014) Testosterone therapy differently regulates the anti- and pro-inflammatory cytokines in  
743 the plasma and prostate of rats submitted to chronic ethanol consumption (UChB). *Am J*  
744 *Reprod Immunol* 72(3):317-25. doi: 10.1111/aji.12268

- 745 Montes GS, Krisztán RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourão PA, Junqueira LC (1980)  
746 Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry*  
747 65(2):131-41. doi: 10.1007/BF00493161  
748
- 749 Montironi R, Santinelli A, Mazzucchelli R (2002) Prostatic intraepithelial neoplasia and  
750 prostate cancer. *Panminerva Med* 44(3):213-20. PMID: 12094135.  
751
- 752 Montironi R, Mazzucchelli R, Santinelli A, Scarpelli M, Beltran AL, Bostwick DG (2005)  
753 Incidentally detected prostate cancer in cystoprostatectomies: pathological and morphometric  
754 comparison with clinically detected cancer in totally embedded specimens. *Hum Pathol*  
755 36(6):646-54. doi: 10.1016/j.humphath.2005.03.018  
756
- 757 Morrison DK, Murakami MS, Cleghon V (2000) Protein kinases and phosphatases in the  
758 *Drosophila* genome. *J Cell Biol* 24;150(2):F57-62. doi: 10.1083/jcb.150.2.f57  
759
- 760 Motrich RD, Salazar FC, Breser ML, Mackern-Oberti JP, Godoy GJ, Olivera C, Paira DA,  
761 Rivero VE (2018) Implications of prostate inflammation on male fertility. *Andrologia*  
762 50(11):e13093. doi: 10.1111/and.13093  
763
- 764 Murata M, Kang JH (2018) Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnol Adv*  
765 36(1):311-327. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.002  
766
- 767 Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, De Marzo AM (2003)  
768 Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is  
769 present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or  
770 hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection.  
771 *Am J Pathol* 163(3):923-33. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63452-9  
772
- 773 Patrick S.M., Bornman M.S., Joubert A.M., Pitts N., Naidoo V., de Jager C (2016) Effects of  
774 environmental endocrine disruptors, including insecticides used for malaria vector control on  
775 reproductive parameters of male rats. *Reprod. Toxicol* 61:19–27. doi:  
776 10.1016/j.reprotox.2016.02.015.  
777
- 778 Prins GS, Tang WL, Belmonte J, Ho SM (2008) Perinatal exposure to oestradiol and  
779 bisphenol A alters the prostate epigenome and increases susceptibility to carcinogenesis.  
780 *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:134–8. doi: 10.1111/j.1742-7843.2007.00166.x  
781
- 782 Pu Y, Wang W, Al-Rubaiee M, Gayen SK, Xu M (2012) Determination of optical coefficients  
783 and fractal dimensional parameters of cancerous and normal prostate tissues. *Appl Spectrosc*  
784 66(7):828-34. doi: 10.1366/11-06471  
785
- 786 Putzi MJ, De Marzo AM (2000) Morphologic transitions between proliferative inflammatory  
787 atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 1;56(5):828-32. doi:  
788 10.1016/s0090-4295(00)00776-7



- 789 Rappaport SM, Smith MT (2010) *Epidemiology. Environment and disease risks*. *Science*  
790 22;330(6003):460-1. doi: 10.1126/science.1192603  
791
- 792 Scarano WR, Toledo FC, Guerra MT, de Campos SG, Júnior LA, Felisbino SL, Anselmo-  
793 Franci JA, Taboga SR, Kempinas Wde G (2009) Long-term effects of developmental  
794 exposure to di-n-butyl-phthalate (DBP) on rat prostate: proliferative and inflammatory  
795 disorders and a possible role of androgens. *Toxicology* 262(3):215-23. doi:  
796 10.1016/j.tox.2009.06.011  
797
- 798 Schaeffer EM, Marchionni L, Huang Z, Simons B, Blackman A, Yu W, Parmigiani G,  
799 Berman DM (2008) Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion  
800 arise in embryogenesis and are reactivated in cancer. *Oncogene* 4;27(57):7180-91. doi:  
801 10.1038/onc.2008.327  
802
- 803 Silva E., Rajapakse N., Kortenkamp A (2002) Something from “nothing”—Eight weak  
804 estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture  
805 effects. *Environ. Sci. Technol* 36:1751–1756. doi: 10.1021/es0101227  
806
- 807 Stoker TE, Robinette CL, Britt BH, Laws SC, Cooper RL (1999) Prepubertal exposure to  
808 compounds that increase prolactin secretion in the male rat: effects on the adult prostate. *Biol*  
809 *Reprod* 61(6):1636-43. doi: 10.1095/biolreprod61.6.1636  
810
- 811 Sweeney MF, Hasan N, Soto AM, Sonnenschein C (2015) Environmental endocrine  
812 disruptors: effects on the human male reproductive system. *Rev. Endocr. Metab. Disord*  
813 16:341-357. doi: 10.1007/s11154-016-9337-4  
814
- 815 Taboga SR, Santos AB, Rocha A, Vidal BC, Mello MLS (2003) Nuclearphenotypes and  
816 morphometry of human secretoty prostatic cells: acomparative study of benign and malignant  
817 lesions in Brazilian patients. *Caryologia* 56:313–320  
818
- 819 Taboga SR, Vilamaior PS, Góes RM (2009) Modulação androgênica e estrogênica na  
820 próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia  
821 estrutural [Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent  
822 experimental models with emphasis on structural biology]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*  
823 53(8):946-55. Portuguese. doi: 10.1590/s0004-27302009000800007  
824
- 825 Tambasco M, Costello BM, Kouznetsov A, Yau A, Magliocco AM (2009) Quantifying the  
826 architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron* 40(4):486-94.  
827 doi: 10.1016/j.micron.2008.12.004  
828
- 829 Taylor JA, Richter CA, Ruhlen RL, vom Saal FS (2011) Estrogenic environmental chemicals  
830 and drugs: mechanisms for effects on the developing male urogenital system. *J Steroid*  
831 *Biochem Mol Biol* 127(1-2):83-95. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.07.005  
832

- 833 Van Hoorde L, Van Aken E, Mareel M (2000) Collagen type I: a substrate and a signal for  
834 invasion. *Prog Mol Subcell Biol* 25:105-34. doi: 10.1007/978-3-642-59766-4\_7  
835
- 836 Van Leenders GJ, Schalken JÁ (2003) Epithelial cell differentiation in the human prostate  
837 epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. *Crit Rev Oncol*  
838 *Hematol* 27;46 Suppl:S3-10. doi: 10.1016/s1040-8428(03)00059-3  
839
- 840 Verze P, Cai T, Lorenzetti S (2016) The role of the prostate in male fertility, health and  
841 disease. *Nat Rev Urol* 13(7):379-86. doi: 10.1038/nrurol.2016.89  
842
- 843 Vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD,  
844 Ganjam VK, Parmigiani S, Welshons WV (1997) Prostate enlargement in mice due to fetal  
845 exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc*  
846 *Natl Acad Sci U S A* 4;94(5):2056-61. doi: 10.1073/pnas.94.5.2056  
847
- 848 Wang X, Wang Y, Song Q, Wu J, Zhao Y, Yao S, Sun Z, Zhang Y (2017) In utero and  
849 lactational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate increased the susceptibility of prostate  
850 carcinogenesis in male offspring. *Reprod Toxicol* 69:60-67. doi:  
851 10.1016/j.reprotox.2017.01.008  
852
- 853 Wasiuk A, de Vries VC, Hartmann K, Roers A, Noelle RJ (2009) Mast cells as regulators of  
854 adaptive immunity to tumours. *Clin Exp Immunol* 155(2):140-6. doi: 10.1111/j.1365-  
855 2249.2008.03840.x  
856
- 857 Weibel ER, Paumgartner D (1978) Integrated stereological and biochemical studies on  
858 hepatocytic membranes. II. Correction of section thickness effect on volume and surface  
859 density estimates. *J Cell Biol* 77(2):584-97. doi: 10.1083/jcb.77.2.584  
860
- 861 Wong RL, Wang Q, Treviño LS, Bosland MC, Chen J, Medvedovic M, Prins GS, Kannan K,  
862 Ho SM, Walker CL (2015) Identification of secretoglobin Scgb2a1 as a target for  
863 developmental reprogramming by BPA in the rat prostate. *Epigenetics* 10(2):127-34. doi:  
864 10.1080/15592294.2015.1009768  
865
- 866 Yaglova NV, Yaglov VV (2012) Endocrine disruptors are a novel direction of endocrinologic  
867 scientific investigation. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* 67(3):56–61. doi:  
868 10.15690/vramn.v67i3.186  
869
- 870 Zhu J, Jiang L, Liu Y, Qian W, Liu J, Zhou J, Gao R, Xiao H, Wang J (2015) MAPK and NF-  
871 κB pathways are involved in bisphenol A-induced TNF-α and IL-6 production in BV2  
872 microglial cells. *Inflammation* 38(2):637-48. doi: 10.1007/s10753-014-9971-5  
873
- 874 Zink D, Fischer AH, Nickerson JÁ (2004) Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*  
875 4(9):677-87. doi: 10.1038/nrc1430. PMID: 15343274.  
876
- 877 Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Woodruff TJ, Vom  
878 Saal FS (2012) Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of

879 principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153(9):4097-110. doi:  
880 10.1210/en.2012-1422  
881  
882

## ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)

22/11/2021 02:04

Certificado

### UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPD - Projeto de Pesquisa Docente

## Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO DA TRÍADE EXPOSIÇÃO-GENE-DOENÇA: EFEITOS DE UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS BASEADA NA EXPOSIÇÃO HUMANA SOBRE O MICROAMBIENTE PROSTÁTICO.", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6034 e tendo como participante(s) MARIA LUIZA SILVA RICARDO (discente), WELLERSON RODRIGO SCARANO (participante externo), ANTHONY CESAR DE SOUZA CASTILHO (docente), LEONARDO DE OLIVEIRA MENDES (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

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

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

#### ANIMAL VIVO

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

Presidente Prudente, 2 de Abril de 2020.

Prof. 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/spp](http://www.unoeste.br/spp) informando o código de segurança **cdbe30a0fee43e505e38fc24fa8bb620**

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

### Instructions for Authors

---

#### General Information

##### *Note on preprint server:*

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

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

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

#### Types of Papers

##### Peer-reviewed contributions:

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

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

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

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

- To authors from non-English language countries:

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

## **Manuscript Submission**

### ***Manuscript Submission***

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

### ***Permissions***

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

### ***Online Submission***

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

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

## **Title Page**

The title page should include:

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

## ***Abstract***

Please provide an abstract of about 10 to 15 lines.

## ***Keywords***

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

## **Text**

### ***Text Formatting***

Manuscripts should be submitted in Word.

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

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

### ***Headings***

Please use no more than three levels of displayed headings.

### ***Abbreviations***

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

### ***Footnotes***

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

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

Always use footnotes instead of endnotes.

### ***Acknowledgments***

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

### ***Additional Information Text Formatting***

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

### **References**

#### ***Citation***

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

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

#### ***Reference list***

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

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

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

- Journal article

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

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

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

- Article by DOI

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



- Book

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

- Book chapter

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

- Online document

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

- Dissertation

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

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

### [ISSN LTWA](#)

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

### ***Specific Remarks***

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

### **Statements & Declarations**

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

### **Funding**

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

Example statements:

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

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

## **Competing Interests**

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

Example statements:

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

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

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

## **Author Contributions**

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

Example statement:

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

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

## **Tables**

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

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

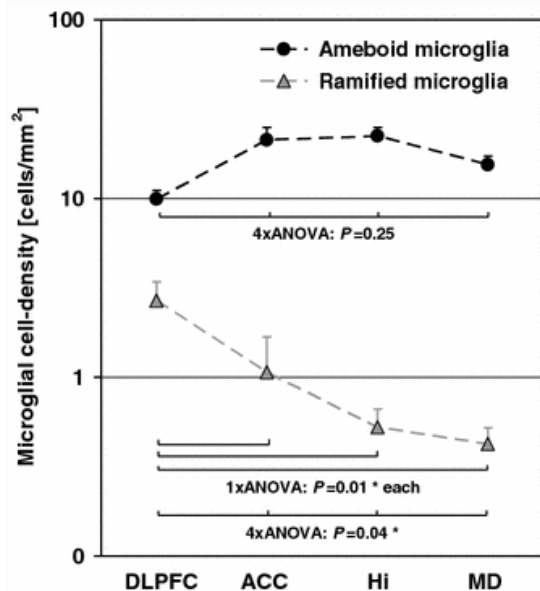
## Artwork

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

## Electronic Figure Submission

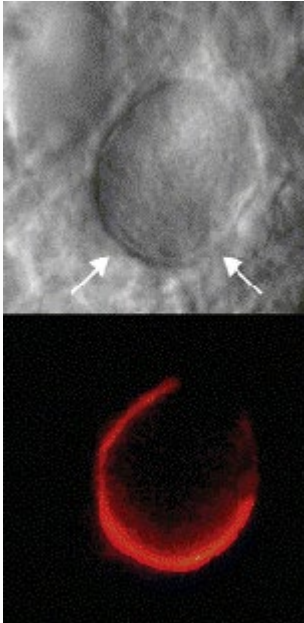
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the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

## Line Art



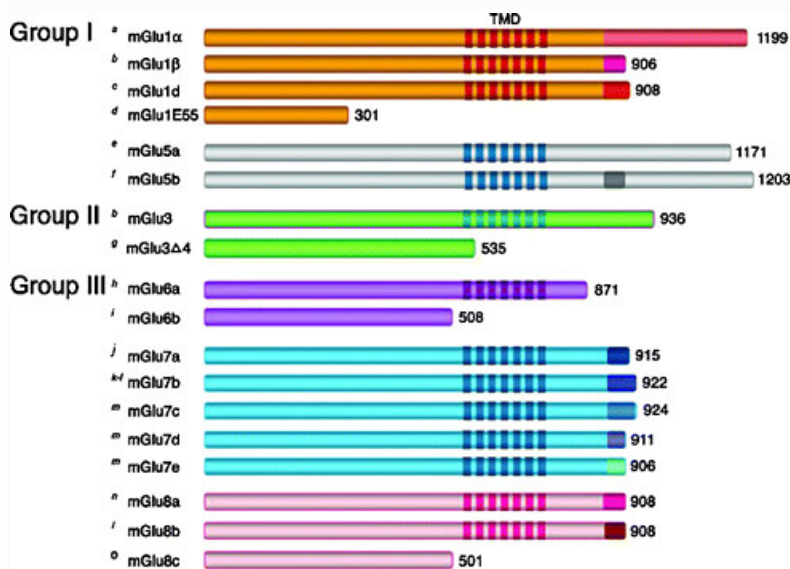
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should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

### Halftone Art



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

### Combination Art



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

### Color Art

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

- Color illustrations should be submitted as RGB.

### ***Figure Lettering***

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

### ***Figure Numbering***

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

### ***Figure Captions***

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

### ***Figure Placement and Size***

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

### ***Permissions***

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able

to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### ***Accessibility***

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

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

### **Supplementary Information (SI)**

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

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

### ***Submission***

- 883
- Supply all supplementary material in standard file formats.
  - Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
  - To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
  - High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

### ***Audio, Video, and Animations***

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

### ***Text and Presentations***

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### ***Spreadsheets***

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

### ***Specialized Formats***

- Specialized format such as .pdb (chemical), .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***

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

### ***Accessibility***

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

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

### ***English Language Editing***

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

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

[Free online grammar check](#)

[English language tutorial](#)

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

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

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

### **Ethical Responsibilities of Authors**

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include\*:

- The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.



- Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

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

- Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).
- Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.
- Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.
- Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).
- Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

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

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

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

- If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

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

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

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

### ***Fundamental errors***

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

### ***Suggesting / excluding reviewers***

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

### **Authorship principles**

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

### ***Authorship clarified***

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

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

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

\* Based on/adapted from:

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

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

### ***Disclosures and declarations***

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

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

### ***Data transparency***

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

### ***Role of the Corresponding Author***

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

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

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

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

### ***Author contributions***

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

### **Examples of such statement(s) are shown below:**

- Free text:

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

### **[Example: CRediT taxonomy:](#)**

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

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

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

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

### *Affiliation*

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

### *Changes to authorship*

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

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

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

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

### *Author identification*

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

### *Deceased or incapacitated authors*

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

### *Authorship issues or disputes*

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

### *Confidentiality*

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

### *Important note:*

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

### **Compliance with Ethical Standards**

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

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

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

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

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

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

## Competing Interests

**Authors** are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

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

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

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

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

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

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

**Non-financial interests:** In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as

professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

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

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

### *Summary of requirements*

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

**Non-financial interests:** none.

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

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

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

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

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

#### **Research Data Policy**

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

[List of Repositories](#)

[Research Data Policy](#)

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

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

### [DataCite](#)

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

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

### **After Acceptance**

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

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

### ***Article publishing agreement***

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

### ***Offprints***

Offprints can be ordered by the corresponding author.

### ***Color illustrations***

Publication of color illustrations is free of charge.

### ***Proof reading***

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

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

### ***Online First***

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

### **Open Choice**

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

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

Benefits:

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

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

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

[Open Choice](#)

[Funding and Support pages](#)

### ***Copyright and license term – CC BY***

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

[Find more about the license agreement](#)

---

**Open access publishing**

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