



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

KARIANNE DELALIBERA HINOKUMA

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA A UMA MISTURA DE DESREGULADORES
ENDÓCRINOS ALTERA O FENÓTIPO NUCLEAR E INDUZ FIBROSE RENAL EM
RATOS**



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

KARIANNE DELALIBERA HINOKUMA

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA A UMA MISTURA DE DESREGULADORES
ENDÓCRINOS ALTERA O FENÓTIPO NUCLEAR E INDUZ FIBROSE RENAL EM
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.

Orientador: Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

636.089
H663e

Hinokuma, Karianne Delalibera.

Exposição crônica a uma mistura de desreguladores endócrinos altera o fenótipo nuclear e induz fibrose renal em ratos / Karianne Delalibera Hinokuma. – Presidente Prudente, 2023.

67 f.: il.

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

Bibliografia.

Orientador: Leonardo de Oliveira Mendes

1. Nefortoxidade. 2. Disruptores endócrinos. 3. Exposição ambiental. I. Título.

KARIANNE DELALIBERA HINOKUMA

**EXPOSIÇÃO CRÔNICA A UMA MISTURA DE DESREGULADORES
ENDÓCRINOS ALTERA O FENÓTIPO NUCLEAR E INDUZ FIBROSE RENAL EM
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, 24 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Dra. Cristiane dos Santos
Vanderbilt University
Nashville – Tennessee/EUA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Billy, que me ensinou o que é amizade.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Priscila e meu pai Fabiano, foi por intermédio do amor de vocês que eu estou realizando este sonho.

Às minhas irmãs Carine e Carol por serem diariamente a minha motivação.

Aos meus amigos Guilherme, Aparecido, Téo, Cezar e João, por muitas vezes foram estrutura.

Ao Dr. Leonardo de Oliveira Mendes por me ensinar a derrubar barreiras e por toda a jornada que construímos juntos.

A todos que envolvidos em cada etapa desta pesquisa. Às amigadas que eu construí durante esses dois anos, Thainá, Andreia, Letícia e sobretudo a Maria Luiza que se tornou uma parceira para a vida.

Agradeço também a parceria com a Universidade Estadual de Londrina, por toda a receptividade das alunas do laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução.

*“Que nada nos defina, que nada nos sujeite, que nada nos limite. Que a liberdade
seja nossa própria substância, já que viver é ser livre”
(Simone de Beauvoir)*

RESUMO

Exposição crônica a uma mistura de desreguladores endócrinos altera o fenótipo nuclear e induz fibrose renal em ratos

Há tempos compostos sintéticos foram introduzidos no cotidiano dos humanos. O conceito do expossoma foi proposto como a avaliação das exposições ambientais e das respostas biológicas associadas ao longo da vida. Disseminados no ambiente, os desreguladores endócrinos (DE) são capazes de modificar a biossíntese hormonal, podendo provocar instabilidades na saúde humana. Por possuírem como característica principal a bioacumulação, o rim torna-se um alvo em potencial dos DE. Desta forma, pesquisas que utilizem protocolos experimentais que mimetizam a exposição humana ao longo da vida são importantes para caracterizar os efeitos dos DE na saúde/homeostase, principalmente no rim, um órgão importante dentro deste sistema de equilíbrio interno. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações celulares e teciduais, além do estresse oxidativo, no rim de ratos expostos durante gestação, lactação e até a vida adulta a uma mistura de DE baseada na exposição humana. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: Grupo Ctrl (veículo: óleo de milho, por gavagem) e Grupo ED Mix: receberam 32,11mg/kg/dia da mistura constituída de doze compostos (ftalatos, pesticidas, filtros u.v., bisfenol A, butilparabeno) diluídos em óleo de milho (2ml/kg), por gavagem. As ratas prenhes ou lactentes receberam o tratamento do dia gestacional 7 (DG7) até o dia pós-natal 21 (DPN21). Após o desmame, no DPN22, os filhotes machos da geração F1 continuaram a receber a mistura completa de DE até os 220 dias de idade, quando foram eutanasiados. O rim foi coletado, dissecado e processado para análise histológica. Secções coradas com hematoxilina-eosina e picrossírius foram submetidas à análise fractal, kariométrica, análise de volume glomerular, perímetro nuclear, fator de alongamento e quantificação dos tipos de colágeno. Além disso, foi realizado estresse oxidativo. Não foi observado alterações nos dados biométricos. As alterações nucleares foram dependentes do compartimento avaliado, com a mistura de DE favorecendo a presença de núcleos elípticos na região cortical e glomerular e núcleos mais arredondados na região medular. Mistura de DE provocou aumento de fibrose renal em todos os compartimentos, sem alteração das enzimas antioxidantes. Em vista disso, concluímos que a exposição ambientalmente relevante à uma mistura de DE provoca alterações nucleares e induz fibrose renal.

Palavras-chave: disruptores endócrinos; rim; exposição ambiental; nefrotoxicidade.

ABSTRACT

Chronic exposure to a mixture of endocrine disruptors alters the nuclear phenotype and induces renal fibrosis in rats

Synthetic compounds have long been introduced into human everyday life. The exposome concept has been proposed as the assessment of environmental exposures and associated biological responses over a lifetime. Disseminated in the environment, endocrine disruptors (ED) are capable of modifying hormone biosynthesis, which may cause instabilities in human health. Because they have bioaccumulation as their main characteristic, the kidney becomes a potential target of ED. Thus, researches using experimental protocols that mimic human exposure throughout life are important to characterize the effects of ED on health/homeostasis, especially in the kidney, an important organ within this internal balance system. Thus, the aim of the present study was to evaluate cellular and tissue changes, in addition to oxidative stress, in the kidney of rats exposed during pregnancy, lactation and even adulthood to an ED mixture based on human exposure. Pregnant females of the Sprague-Dawley strain were randomly divided into 2 experimental groups: Ctrl Group (vehicle: corn oil, by gavage) and ED Mix group: they received 32.11mg/kg/day of a mixture consisting of twelve compounds (phthalates, pesticides, u.v. filters, bisphenol A, butylparaben) diluted in corn oil (2ml/kg), by gavage. Pregnant or lactating rats received the treatment from gestational day 7 (DG7) until postnatal day 21 (DPN21). After weaning, at DPN22, the male offspring of the F1 generation continued to receive the complete EDmixture until they were 220 days old, when they were euthanized. The kidney was collected, dissected and processed for histological analysis. Sections stained with hematoxylin-eosin and picrosirius were submitted to fractal and kariometric analysis, analysis of glomerular volume, nuclear perimeter, elongation factor and quantification of collagen types. In addition, oxidative stress was performed. No changes were observed in the biometric data. Nuclear alterations were dependent on the evaluated compartment, with the ED mixture favoring the presence of elliptical nuclei in the cortical and glomerular region and more rounded nuclei in the medullary region. ED mixture caused an increase in renal fibrosis in all compartments, without altering antioxidant enzymes. In view of this, we conclude that environmentally relevant exposure to a ED mixture causes nuclear changes and induces renal fibrosis.

Keywords: endocrine disruptors; kidney; enviromental exposure; nefrotoxicity.

LISTA DE SIGLAS

HP	-Hidroperóxido de lipídio
BPA	- Bisfenol A
CAT	- Catalase
DBP	- Di-n-butil ftalato
DDE	- Diclorodifenil-dicloroetileno
ED	-Endocrine Disruptors
DE	- Desregulador endócrino
DEHP	- Di-(2-etilexil) ftalato
DG0	- Dia gestacional 0
DG7	- Dia gestacional 7
SOD	-Superóxido dismutase
DHT	- Dihidrotestosterona
DPN21	- Dia pós-natal 21
DPN22	- Dia pós-natal 22
DPN220	- Dia pós-natal 220
DRC	- Doença Renal Crônica
EPA	- Agência de Proteção Ambiental dos EUA
HE	- Hematoxilina e eosina
4-MBC	- 4-metil-benzidileno cânfora
OMC	- Metoxinamato de Octila
PSR	- Picrossírius
EMT	-Transição epitelial-mesenquimal
GST	-Glutathione s-transferase
GSH	-Glutathione reduzida

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
	ANEXO 1- PARECER FINAL DO COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL E COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS.....	44
	ANEXO 2- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH.....	45

1 ARTIGO CIENTÍFICO

EXPOSIÇÃO CRÔNICA A UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS ALTERA O FENÓTIPO NUCLEAR E INDUZ FIBROSE RENAL EM RATOS

Karianne Delalibera Hinokuma¹, Maria Luiza Silva Ricardo¹, Andreia Yuri Yoshigae¹, Thaina Cavalleri Sousa¹, Letícia Pereira de Souza², Gisele Alborghetti Nai^{1,3}, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes⁴, Ivana Regina da Costa⁴, Leonardo de Oliveira Mendes^{1,3*}.

Short Title: Histopatologia Renal e Desreguladores Endócrinos

¹*Graduate Program in Animal Science, Western São Paulo University (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro, Presidente Prudente – SP-Brasil;*

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

³*Master Program in Health Science, Western São Paulo University (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572 – Bairro do Limoeiro, Presidente Prudente – SP-Brasil;*

⁴*Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, 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.

Authors Contributions

“All authors contributed to the study conception and design. Material preparations and data collection were performed by Karianne Delalibera Hinokuma, Letícia Pereira de Souza, Maria Luiza Silva Ricardo, Andreia Yuri Yoshigae and Leonardo de Oliveira Mendes. The data analysis were performed by Karianne Delalibera Hinokuma, Giselle Alborghetti Nai and Leonardo de Oliveira Mendes. Oxidative stress were performed by Glaura Scantamburlo Alves Fernandes and Ivana Regina da Costa. All authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.”

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

RESUMO

O conceito do expossoma foi proposto como a avaliação das exposições ambientais e das respostas biológicas associadas ao longo da vida. Nesta exposição, os desreguladores endócrinos (DE) possuem importante papel, provocando instabilidade na saúde humana. Por possuírem como característica principal a bioacumulação, o rim torna-se um alvo em potencial dos DE. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações celulares e teciduais, além do estresse oxidativo, no rim de ratos expostos durante gestação, lactação até a vida adulta a uma mistura de DE baseada na exposição humana. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: Grupo Ctrl (veículo: óleo de milho, por gavagem) e Grupo ED Mix: receberam 32,11mg/kg/dia da mistura constituída de doze compostos (ftalatos, pesticidas, filtros u.v., bisfenol A, butilparabeno) diluídos em óleo de milho (2ml/kg), por gavagem. As ratas prenhes ou lactentes receberam o tratamento do dia gestacional 7 (DG7) até o dia pós-natal 21 (DPN21). Após o desmame, no DPN22, os filhotes machos da geração F1 continuaram a receber a mistura completa de DE até o DP220, quando foram eutanasiados. O rim foi coletado, dissecado e processado para análise histológica. Secções coradas com hematoxilina-eosina e picrossírius foram submetidas à análise fractal, kariométrica, análise de volume glomerular, perímetro nuclear, fator de alongamento, quantificação dos tipos de colágeno e estresse oxidativo. As alterações nucleares foram dependentes do compartimento avaliado, com a mistura de DE favorecendo a presença de núcleos elípticos na região cortical e glomerular e núcleos mais arredondados na região medular. Mistura de DE provocou aumento de fibrose renal em todos os compartimentos, sem alteração das enzimas antioxidantes. Em vista disso, concluímos que a exposição ambientalmente relevante à uma mistura de DE provoca alterações nucleares e induz fibrose renal.

Palavras-chave: disruptores endócrinos, rim, exposição ambiental, nefrotoxicidade.

48 1. INTRODUÇÃO

49

50 Ao longo da vida, os seres humanos estão sujeitos a exposições a uma grande
51 variedade de fatores simultaneamente. Dá-se o nome de “expossoma”, conceito proposto
52 em 2005 por Wild e refinado posteriormente por Miller e Jones (2014), à avaliação das
53 exposições ambientais e das respostas biológicas associadas ao longo da vida. Nesta gama
54 de fatores aos quais os seres humanos estão expostos encontram-se os desreguladores
55 endócrinos (DE). O impacto de tais compostos na saúde é, atualmente, um campo atrativo
56 para pesquisas experimentais e epidemiológicas (Bergman et al., 2013).

57 Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), DE são
58 definidos como qualquer agente capaz de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação
59 ou eliminação de hormônios endógenos responsáveis pela manutenção da homeostase
60 corpórea (Kavlovk et al., 1996). Tais substâncias são facilmente encontradas na cadeia
61 alimentar e no meio ambiente, em uma ampla gama de materiais de uso comum, como
62 cosméticos farmacêuticos, conservadores de alimentos, pesticidas domésticos e agrícolas,
63 materiais de construção, plásticos e produtos de limpeza (Monneret, 2017).

64 A exposição aos DE pode causar uma perturbação na função do sistema endócrino,
65 além de efeitos deletérios em outros sistemas como imunológico, nervoso, hepático e renal
66 (Ashari et al., 2020). Pesquisas confirmam que o rim é um importante alvo após a exposição
67 a produtos químicos, o que pode descaracterizar o seu microambiente tecidual (Kataria et
68 al., 2015; Pawar et al., 2016; Shi et al., 2021). Poucos são os estudos que avaliam os efeitos
69 de DE no rim, tornando este órgão negligenciado nas pesquisas científicas quando
70 comparado com órgãos reprodutores e endócrinos.

71 Wu e colaboradores (2018), ao avaliarem um modelo de camundongo com fibrose
72 renal induzida por ácido fólico, verificaram que a exposição ao DEHP (di-2-etilexil-ftalato),
73 um ftalato de uso industrial que proporciona aumento da flexibilidade aos plásticos,
74 exacerbou a fibrose nefropatia renal. O composto estimulou a transição epitelial-
75 mesenquimal (EMT), levando à progressão da fibrose. Um DE semelhante ao DEHP, o
76 diisononil ftalato (DINP), provocou dano oxidativo e alterações histopatológicas, com redução
77 do espaço tubular e presença de edema nos glomérulos de ratos após exposição dérmica
78 (Liang et al., 2020). Em outro estudo, a exposição aguda intraperitoneal ao bisfenol A, um

79 plastificante de uso industrial para a produção de plásticos de policarbonato e resina epóxi,
80 causou dilatação tubular e infiltração de células inflamatórias (Priego et al., 2021).

81 Um dos primeiros obstáculos para as pesquisas envolvendo esses compostos
82 sintéticos consiste na fragmentação da exposição, no qual os pesquisadores tendem a se
83 concentrar na análise isolada ou categorizada das substâncias (Rappaport & Smith, 2010),
84 como descrit o acima. Ao invés de avaliar um a um ou grupos de dois a três fatores em
85 curtos períodos, o objetivo dessa abordagem foi analisar simultaneamente o maior número
86 destes, apesar da maior complexidade do delineamento experimental e dos métodos
87 necessários para atingir os objetivos (Holland, 2017).

88 Christiansen et al. (2012) estabeleceram uma mistura de doze compostos químicos
89 selecionados como representativos de vários outros DE, com o intuito de simular uma
90 exposição humana. A composição da mistura constitui-se de 2 ftalatos: di-n-butil ftalato
91 (DBP) e DEHP; 5 pesticidas: vinclozin, procloraz, procimidona, linuron, epoxiconazol; o
92 metabólito do pesticida DDT, diclorodifenil-dicloroetileno (p,p'-DDE). Esses 8 compostos são
93 caracterizados por possuírem, predominantemente, propriedades anti-androgênicas. Além
94 disso, a mistura também contém 4 substâncias predominantemente estrogênicas: dois
95 filtros U.V., o metoxinamato de octila (OMC) e o 4-metil-benzidileno cânfora (4-MBC); o
96 composto fenólico BPA; o preservativo antifúngico butilparabeno (Christiansen et al., 2012;
97 Axelstad et al., 2014; Isling et al., 2014; Boberg et al., 2015).

98 Além da utilização de misturas de DE, o período de exposição também é uma
99 importante variável a ser avaliada. Até o momento, a literatura científica tem focado apenas
100 em períodos curtos e definidos, como o proposto por Zhu et al. (2017). Tais autores
101 demonstraram que a exposição gestacional (12° ao 18° dia) ao di-n-butilftalato (DBP), usado
102 como componente de cosméticos, em plásticos de celulose, solvente para corantes e em
103 adesivos de látex, foi responsável por causar displasia renal e fibrose na vida adulta.

104 Diante de tal cenário, torna-se evidente a importância de estudos que se aproximem
105 da real exposição à qual os seres humanos estão submetidos ao longo da vida. Assim, a
106 presente proposta tem como objetivo caracterizar as alterações celulares e teciduais, além
107 do estresse oxidativo, no rim de ratos expostos durante gestação, lactação e até a vida
108 adulta à uma mistura de DE baseada na exposição humana.

109 2. MATERIAIS E MÉTODOS

110

111 2.1 Animais e Ambiente de Experimentação

112 Foram utilizadas 24 fêmeas adultas com 120 dias de idade e 12 machos adultos com
113 90 dias de idade, ambos da linhagem Sprague-Dawley pesando aproximadamente 300g e
114 obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais
115 de Laboratório (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos no Biotério de Pequenos
116 Mamíferos da UNOESTE, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/12
117 horas de escuro) e temperatura (média de 23°C a 25°C) recebendo ração comercial livre de
118 fitoestrógenos (NUVILABCR1/NuvitalPR) e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa
119 e bico metálicos com capacidade para 500 mL. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os
120 animais foram distribuídos na proporção de duas a três fêmeas e um macho adulto para
121 acasalamento por gaiola de polipropileno de 41x34x16cm, com tampa de aço inox na forma
122 de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, sendo as trocas das gaiolas
123 e da maravalha realizadas 2 vezes por semana. Durante toda a fase de experimentação
124 foram controladas as condições de umidade relativa do ar (55 ± 10) e exaustão do ar
125 contínua. Os procedimentos de manuseio, administração de drogas, anestesia e eutanásia
126 dos animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNOESTE
127 (Protocolo CEUA 6034).

128

129 2.2 Mistura de DE

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

137

138 2.3 Delineamento Experimental

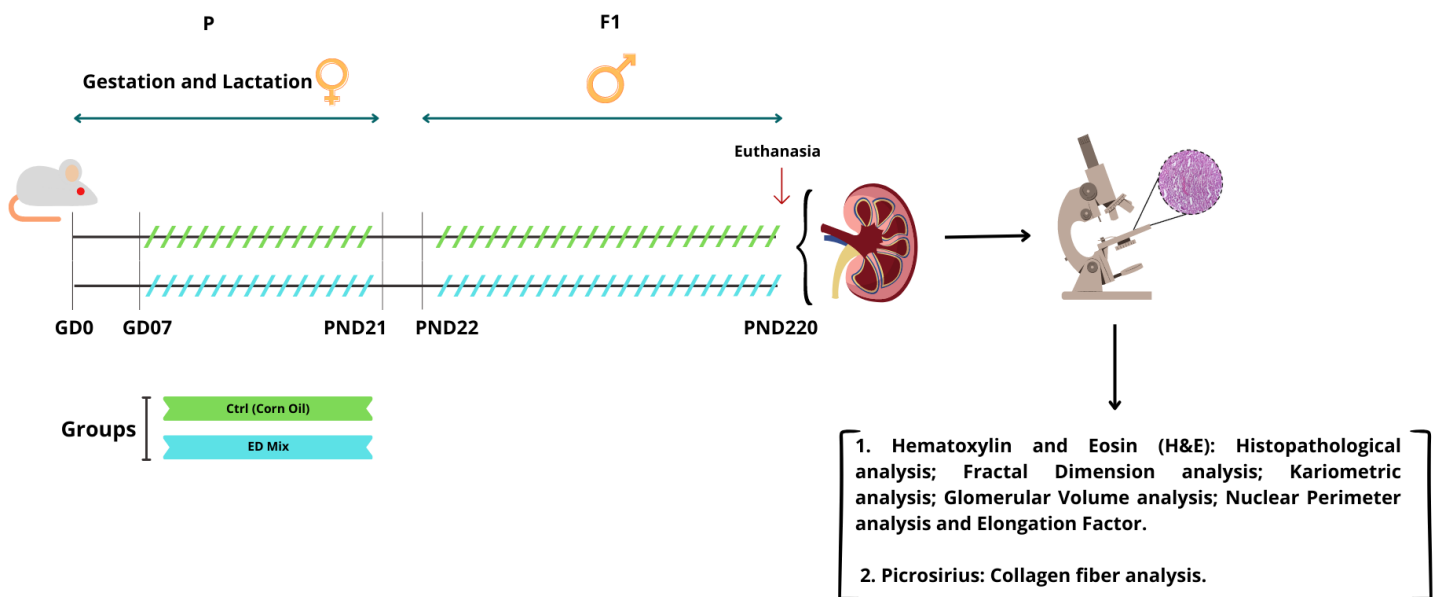
139 Os acasalamentos foram realizados durante o período escuro do ciclo, onde foram
140 colocadas de duas a três fêmeas na caixa do macho. O dia zero de prenhez/gestacional

141 (DG0) foi determinado pela presença de esperma no esfregaço vaginal e a citologia vaginal
142 positiva da fase de estro. As fêmeas identificadas como prenhes foram mantidas
143 individualmente nas gaiolas e divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais
144 (n=10/grupo): Grupo ED Mix: 32,11 mg/kg/dia da mistura de DE diluídos em óleo de milho (2
145 ml/kg); Grupo Ctrl: (veículo: 2 ml/kg óleo de milho, por gavagem).

146 Os animais do grupo ED Mix receberam uma mistura de DE desenvolvida por
147 Christiansen et al. (2012) e reproduzida por Axelstad et al. (2014), Isling et al. (2014), Boberg
148 et al. (2015), Mandrup et al. (2015) e Johansson et al. (2016). A composição da mistura foi
149 elaborada a partir do consumo humano ajustado (mg/kg peso corpóreo/dia) e estabelecido
150 um fator de correção de 100, que é comumente utilizado para extrapolação de doses
151 seguras (concentrações sem efeitos adversos observáveis – NOAEL: no observed adverse
152 effect levels) determinadas em estudos com roedores para doses que podem ser
153 consideradas seguras para humanos (ECHA, 2010). A composição da mistura consiste em
154 DBP (0,01), DEHP (0,02), vinclozin (0,009), procloraz (0,014), procimidona (0,015), linuron
155 (0,0006), epoxiconazol (0,01), p,p'-DDE (0,001), 4-MBC (0,06), OMC (0,12), bisfenol A
156 (0,0015) e butilparabeno (0,06), quando multiplicados por 100, formam uma mistura de
157 32,11mg/kg de peso corpóreo ao dia (Christiansen et al. 2012). Neste procedimento, a
158 mistura de DE sofreu adaptação em relação à original, com conseqüente remoção do
159 paracetamol da sua composição, em virtude do potencial hepatotóxico que a droga possui,
160 não sendo possível a realização de uma exposição diária e prolongada.

161 A mistura de DE foi administrada nas ratas prenhes/lactentes do dia gestacional 7
162 (DG7) até o dia pós-natal 21 (DPN21), nos mesmos períodos (8h à 10h). As ratas foram
163 mantidas em gaiolas individuais e pesadas em dias alternados para permitir o cálculo do
164 volume da mistura de DE. Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi ajustado
165 para 8 por ninhada (4 fêmeas e 4 machos) a fim de manter a proporção entre machos e
166 fêmeas de 1:1, e ninhadas com número de filhotes inferior a 7 foram descartadas da
167 pesquisa. Posteriormente, no DPN 22, foi realizado o desmame dos filhotes machos, que
168 foram alojados em caixas contendo 3 animais cada. Os animais continuaram recebendo o
169 tratamento com a mistura completa de DE diariamente até os 220 dias de idade (Figura 1),
170 no qual foram eutanasiados por meio de aplicação intramuscular de overdose dos
171 anestésicos xilazina e cetamina. O rim foi removido, pesado e utilizado para as análises.

172



173 **Figura 1.** Representação esquemática do delineamento experimental. As linhas referem-se
 174 ao período de exposição das ratas prenhas (GD07 a PND21) e da prole (PND22 a PND220)
 175 com a mistura de 12 DE. As linhas verdes representam a gavagem para o grupo exposto
 176 apenas ao óleo de milho e linhas azuis para a exposição à mistura de DE. Período da
 177 eutanásia (seta vermelha – PND220). GD (Gestational Day); PND (Postnatal Day).
 178

179 2.4 Índice Órgão-Somático

180 O peso dos ratos foi registrado logo após a aplicação intramuscular dos
 181 anestésicos, seguido pela eutanásia. O peso de cada rim foi registrado e o coeficiente do
 182 órgão foi calculado como peso do órgão/peso corpóreo x 100%. O parâmetro orgão-
 183 somático avalia as condições do bem-estar animal (Schmitt et al. 2020).

184

185 2.5 Análise da estrutura renal

186 Os fragmentos do rim foram fixados por imersão em metacarn (6 metanol: 3
 187 clorofórmio: 1 ácido acético) e mantidos em álcool 70%. Com isso, posteriormente o
 188 material foi desidratado em soluções crescentes de etanol, clarificado em xilol e incluído em
 189 paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO, USA).

190 Os fragmentos incluídos em paraplast foram seccionados com 4µm de espessura em
 191 micrótomo rotativo e submetidos às seguintes colorações:

192 **1. Hematoxilina - Eosina (HE):** análise da dimensão fractal, análise kariométrica, análise de
 193 volume glomerular, análise de perímetro nuclear e fator de alongamento.

194 **2. Picrossírius:** análise das fibras de colágeno.

195

196 **2.5.1 Análise Histopatológica**

197 A análise histopatológica foi realizada de forma cega por observador experiente
198 usando um microscópio óptico padrão (NIKON Labohot, Japão). Os parâmetros avaliados no
199 rim foram: congestão, vacuolização citoplasmática, infiltrado inflamatório, hemorragia,
200 vacuolização nuclear, fusão tubular e necrose. Cada avaliação para cada animal foi pontuada
201 entre 0-3 (0: sem alteração, 1: leve, 2: moderada, 3: grave). O escore máximo para cada
202 amostra foi 21 e o escore mínimo foi 0. Para cada rim de cada animal somaram-se os escores
203 dos diferentes parâmetros e determinou-se o escore histopatológico médio do órgão.
204 (Sümer, et al., 2020)

205

206 **2.5.2 Análise Kariométrica**

207 A análise kariométrica foi realizada em secções histológicas coradas com H.E. de 10
208 animais/grupo, sendo fotografado 4 campos histológicos/secção, aumento de 100x e
209 realizada a medição de 5 regiões nucleares/fotografias aleatórias. Áreas de seção transversal
210 nuclear (μm^2) e perímetros (μm) foram determinados para núcleos de 200 células epiteliais
211 para obter o fator de forma $[=4\pi.\text{área nuclear}/(\text{nuclear perímetro})^2]$ parâmetro. O
212 parâmetro do fator de forma mede arredondamento e valores <1 estão associados a núcleos
213 menos redondos, como estabelecido por Taboga et al. (2003).

214

215 **2.5.3 Análise Fractal**

216 Foram analisadas secções histológicas, coradas com H.E., de 10 animais/grupo, sendo
217 fotografadas (10 campos histológicos/secção, aumento de 40x), binarizadas para leitura da
218 dimensão fractal.

219 Para análise fractal foi utilizado como ferramenta o software Image J (Instituto
220 Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na Internet
221 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), pelo método box-counting. O software considerou o box-
222 counting em duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de pixels nesse
223 espaço dessa forma não considerando a textura da imagem. Com isso as duas imagens com
224 a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza, possuirão a
225 mesma dimensão fractal. Dessa forma, as análises foram guiadas na relação entre a

226 resolução e a escala avaliada, e o resultado fora quantitativamente expresso como a
227 dimensão fractal do objeto que é $DF = (\log N_r / \log r - 1)$, sendo N_r a quantidade de elementos
228 iguais necessários para preencher o objeto original e r a escala aplicada ao objeto. A
229 dimensão fractal foi então calculada com o software Image J ficando sempre entre 0 e 2, não
230 distinguindo texturas diferentes (Franchi et al. 2020).

231

232 **2.5.4 Análise do Volume Glomerular**

233 Foram selecionados pelo menos cem glomérulos para cada grupo; os diâmetros mais
234 curto e mais longo para cada glomérulo foram medidos usando o software Image J. O
235 volume glomerular foi calculado pela seguinte fórmula: $4\Pi(d(G)/2)^3/3$, onde $d(G)$ representa
236 a média aritmética dos diâmetros maior e menor (Yildiz et al; 2013).

237

238 **2.5.5 Análise Perímetro Nuclear e Fator de Alongamento**

239 Foi realizada em secções histológicas coradas com H.E. de 10 animais/grupo, sendo
240 fotografado 4 campos histológicos/secção, aumento de 100x e realizada a medição de 5
241 regiões nucleares/secção histológica. Para cada núcleo foi avaliado o perímetro (μm) e o
242 fator de alongamento [diâmetro menor/diâmetro maior]. Para o fator de alongamento
243 valores =1 foram associados a núcleos circulares e <1 para estruturas elípticas. (Monge et
244 al.,1999).

245

246 **2.5.6 Quantificação dos Colágenos tipo I e tipo III**

247 Foram analisadas secções histológicas, coradas com Picrossirius, de 10
248 animais/grupo, sendo fotografadas (10 campos histológicos/secção, aumento de 40x). As
249 lâminas foram analisadas utilizando luz polarizada, que diferencia os tipos de colágeno
250 através da intensidade das fibras birrefringentes. Mais especificamente, a coloração
251 avermelhada representa o colágeno tipo I e a cor esverdeada refere-se ao colágeno tipo III
252 (Junqueira et al., 1978; Montes et al., 1980). Usando a ferramenta RGB measure do Image J,
253 as fibras de colágeno foram diferenciadas e quantificadas. Este método mede
254 separadamente os canais vermelho, verde e azul de uma imagem RGB (Image J, 2004).

255 **2.6 Análise de estresse oxidativo**

256 O tecido foi homogeneizado entre 45 e 60s em um homogeneizador Ultraturrax
257 (Marconi) que continha 50 mg/mL de tecido em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ e 30 mM e KCl 120
258 mM em pH 7,4. Os homogeneizados foram centrifugados a 11.000 rpm por 15 min a 4 °C, e o
259 sobrenadante foi utilizado para as análises descritas abaixo.

260 *2.6.1 Lipoperoxidação:* Foi determinada através da análise do hidroperóxido de lipídio (HP) o
261 qual evidencia uma das fases da oxidação de ácidos graxos (AVIRAM, EIAS, 1993; PARFITT et
262 al, 1994). O hidroperóxido será determinado através da oxidação do ferro (Fe^{2+} , sulfato
263 ferroso amoniacal). O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol formando composto
264 colorido que pode ser lido a 560nm (JIANG, WOOLLARD, WOLFF, 1991).

265 *2.6.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD):* A atividade da SOD foi determinada através
266 da redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH
267 e fenazina metassulfato em pH fisiológico mensurada a 560nm durante (EWING; JANERO,
268 1995).

269 *2.6.3 Atividade da Catalase:* A atividade enzimática da CAT foi determinada pela degradação
270 do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Após a determinação da concentração de
271 proteínas (normalizadas 1,0 mg/ml em PBS), 297 μl de meio de reação foi colocado em
272 microplaca de UV4 (em triplicata) a 240nm por 60 segundos (AEBI, 1984).

273 *2.6.4 Atividade da Glutaciona S-transferase (GST):* A atividade da Glutaciona-S-transferase foi
274 avaliada por espectrofotometria com CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) de acordo com
275 Keen e colaboradores (1976) com base na respectiva conjugação com a glutaciona.

276 *2.6.5 Avaliação dos níveis de glutaciona reduzida (GSH):* Glutaciona reduzida (GSH) foi
277 avaliada de acordo com método descrito por Sedlak e Lindsay (1968) com adaptações de
278 Siervo e colaboradores (2015). Os níveis de GSH foram determinados com DITIOBIS-5,5-(2-
279 NITRO- ACIDO BENZOICO) em sobrenadante de homogenato de coração evidenciados pela
280 formação de coloração amarela. Os níveis de GSH foram avaliados em 412 nm e os
281 resultados expressos em micromol/mg de proteína.

282

283 **2.7 Análise Estatística**

284 Os resultados obtidos nas análises foram testados estatisticamente pelo teste de
 285 normalidade de Shapiro-Wilk, onde constatou-se que os dados biométricos (índice organo-
 286 somático e peso absoluto do rim) análise de perímetro nuclear (glomérulo e córtex), análise
 287 fractal por picrossírius (córtex e glomérulo) e análise de estresse oxidativo (catalase,
 288 superóxido dismutase, glutatona S-transferase e glutatona reduzida) eram paramétricos.
 289 Posteriormente, foi aplicado o teste T-student para averiguação da significância entre os
 290 grupos através do software Prism 5.0 (GraphPad) (significância com valor de $p < 0,05$). Já a
 291 análise kariométrica (córtex, glomérulo, medula), análise de perímetro nuclear (medula),
 292 análise de quantificação de colágeno tipo I e III (córtex, glomérulo e medula), análise fractal
 293 por HE (córtex, glomérulo e medula) e picrossírius (medula), análise de volume glomerular,
 294 análise de área nuclear (córtex, glomérulo e medula) e análise de estresse oxidativo
 295 (lipoperoxidação) não obtiveram distribuição normal, sendo aplicado o teste não
 296 paramétrico de Mann-Whitney (significância com valor de $p < 0,05$).

297

298 3 RESULTADOS

299 Com relação aos dados biométricos, não foi verificada alteração no índice organo-
 300 somático e no peso do rim (Tabela 1). Quanto ao peso corpóreo também não foram
 301 verificadas alterações ao longo dos períodos avaliados (dados não apresentados).

302

303 **Tabela 1.** Dados biométricos da prole de ratos expostos durante a gestação, lactação até
 304 a vida adulta a uma mistura de DE baseada na exposição humana. Os resultados são
 305 expressos em média \pm DP. $p < 0,05$ em relação ao grupo Ctrl.

Parameters	Ctrl	ED MIX
Organosomatic Indices	0.3194 \pm 0.019	0.3208 \pm 0.028
Absolute Kidney Weight	1,578 \pm 0.213	1,634 \pm 0,156

306

307 A tabela 2 mostra que a exposição mistura de DE não alterou os parametros de
 308 volume glomerular, área nuclear, enzimas antioxidantes e lipoperoxidação.

309

310 **Table 2.** Parâmetros morfofuncionais e estresse oxidativo. Os resultados são expressos
 311 em média \pm DP e mediana [intervalo interquartil].

Parameters	Ctrl	ED MIX
------------	------	--------

Glomerular Volume x 10 ⁶ (μm ³)	0,65 [0,18; 1,48]	0,69 [0,27; 1,62]
Nuclear Area		
<i>Medulla</i>	28,40 [17,28; 50,13]	29,11 [12,46; 49,81]
<i>Cortex</i>	28,80 [14,03; 44,24]	27,82 [12,26; 45,14]
<i>Glomerulus</i>	15,08 [6,38; 34,01]	14,50 [4,39; 37,06]
Oxidative Stress		
<i>Superoxide dismutase^c</i>	6,66 ± 0,21	6,80 ± 0,29
<i>Catalase^a</i>	74,25 ± 40,35	76,50 ± 40,92
<i>Glutathione reductase^b</i>	14,55 ± 3,98	17,80 ± 5,90
<i>Glutathione s-transferase^a</i>	32,03 ± 11,80	31,67 ± 17,46
<i>Lipid peroxidation^d</i>	3,38 [2,67; 3,62]	3,12 [2,79; 3,72]

312 ^a mM/mg de proteína

313 ^b μg/mg de proteína

314 ^c U/mg de proteína

315 ^d nM/mg de proteína

316

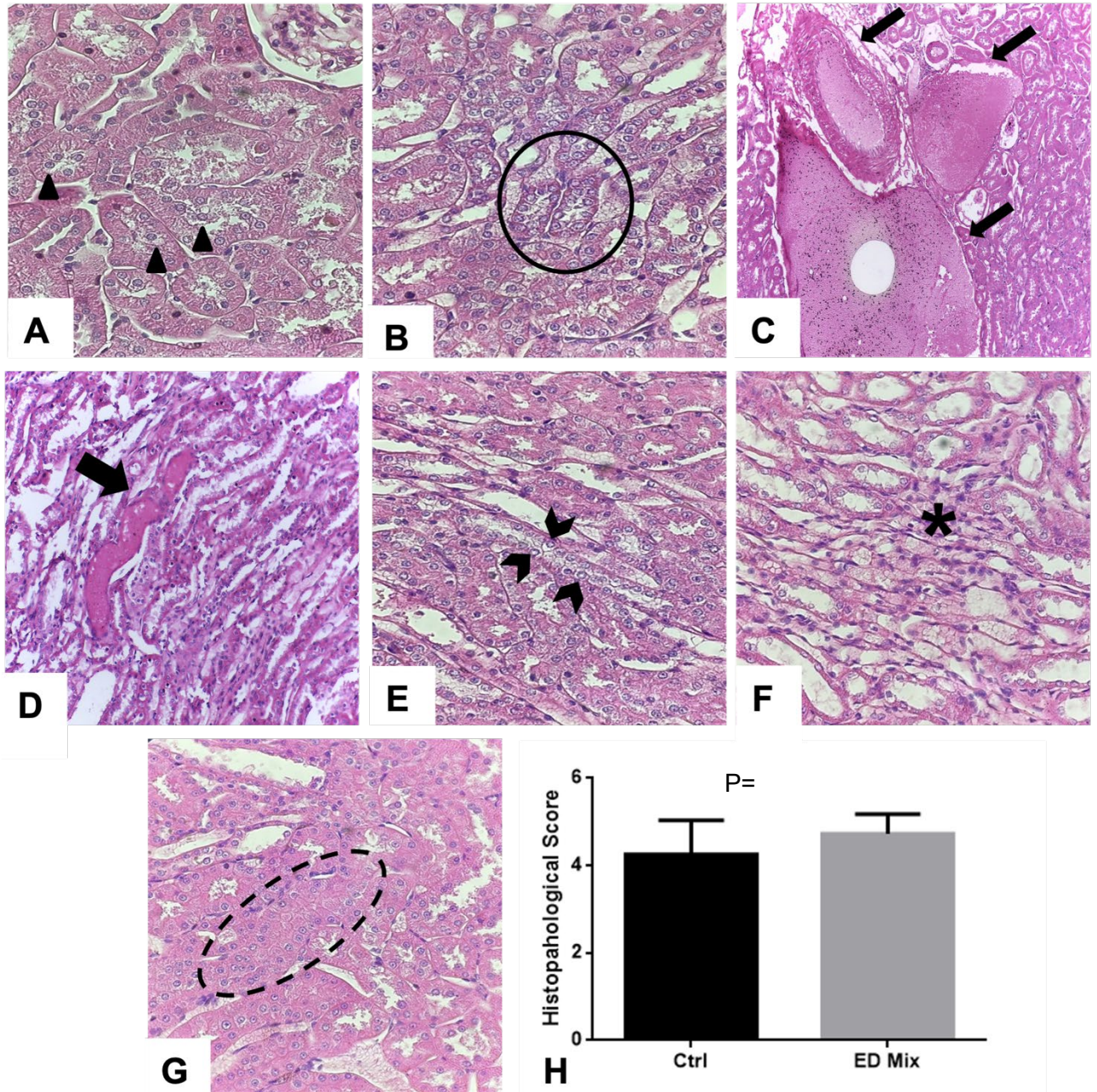
317 As alterações histopatológicas observadas no rim foram: vacuolização
318 citoplasmática (tabela 3 e figura 2A, triângulo), necrose (tabela 3 e figura 2B, círculo),
319 congestão venosa (tabela 3 e figura 2C, setas finas), hemorragia (tabela 3 e figura 2D, seta
320 grossa), vacuolização nuclear (tabela 3 e figura 2E, cabeça de seta), infiltrado inflamatório
321 (tabela 3 e figura 2F, asterisco), além de fusão tubular (tabela 3 e figura 2G, círculo
322 tracejado). A média dos escores não evidenciou diferença entre os grupos (figura 2H).

323

324 **Tabela 3.** Escore histopatológico de ratos expostos à mistura de DE.

	Ctrl	ED MIX
Number of Animals Examined	12	11
Parameters		
Cytoplasmic Vacuolization	8/12	10/11
Necrosis	3/12	1/11
Congestion	12/12	11/11
Hemorrhage	2/12	1/11
Nuclear Vacuolization	2/12	4/11
Inflammatory Infiltrates	4/12	5/11
Tubular Fusion	2/12	1/11

325



326

327 **Figura 2.** Secções histológicas e escore histopatológico no rim de ratos expostos durante a
 328 gestação, lactação e até a fase adulta à uma mistura DE. Detalhes das lesões renais
 329 identificadas nos grupos experimentais: (A) vacuolização citoplasmática (triângulo), (B)
 330 necrose (círculo), (C) congestão venosa (setas finas), (D) hemorragia (seta grossa), (E)
 331 vacuolização nuclear (cabeça de seta), (F) infiltrado inflamatório (asterisco), (G) além de
 332 fusão tubular (círculo tracejado). (n=10/grupo). Aumento de 40X. Colorações: H&E. (H)
 333 Representação gráfica da média dos escores histopatológicos. Os resultados foram
 334 expressos em média \pm DP. Teste T- Student.

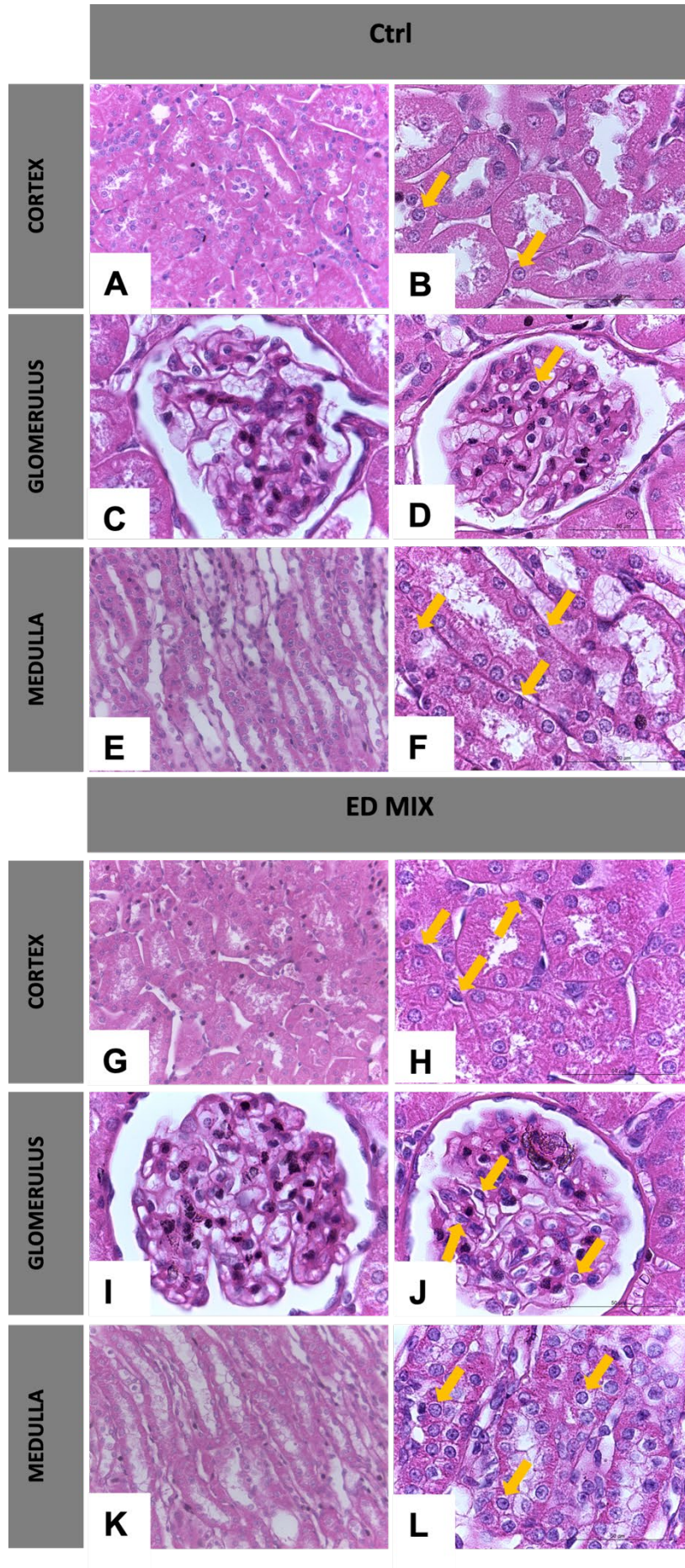
335

336

337 A exposição mistura de DE alterou os fenótipos nucleares das células renais, sendo
338 estas alterações dependentes do compartimento avaliado (Figura 3). A análise kariométrica
339 indicou que a mistura de DE foi responsável por diminuir o fator forma nos núcleos do córtex
340 e aumentar na medula, indicando núcleos menos arredondados nas células epiteliais do
341 córtex e mais arredondados nas respectivas células medulares (Figura 3, setas). A análise
342 fractal também apontou diferença entre os grupos experimentais, mostrando aumento da
343 dimensão fractal no grupo exposto à mistura de DE apenas na região cortical (Figura 4G).

344 Com relação ao perímetro e o fator de alongamento, estes apresentaram
345 diferenças, tanto no compartimento glomerular como medular (Figura 4). No
346 compartimento medular, a mistura de DE foi responsável por diminuir o perímetro nuclear e
347 aumentar o fator de alongamento (Figura 4F e L). Por outro lado, no glomérulo houve
348 redução de ambos os parâmetros (Figura 4E, K).

349



351 **Figura 3.** Secções histológicas dos diferentes compartimentos renais (córtex, glomérulo
352 e medula). A região cortical e glomerular no grupo Ed Mix apresenta núcleos elípticos (H, J,
353 setas) enquanto no grupo controle os mesmos se apresentaram mais arredondados (B, D,
354 setas). Ao analisar a região medular, estes resultados se apresentam de forma inversa, no
355 qual o Ed Mix apresentou núcleos mais arredondados (L, setas) e o grupo controle apresentou
356 núcleos elípticos (F, setas). Aumento de 40X (A, E, G, K). Aumento de 100x (B, C, D, F, H, I, L)
357 (10 animais/ grupo). Colorações: H&E.

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

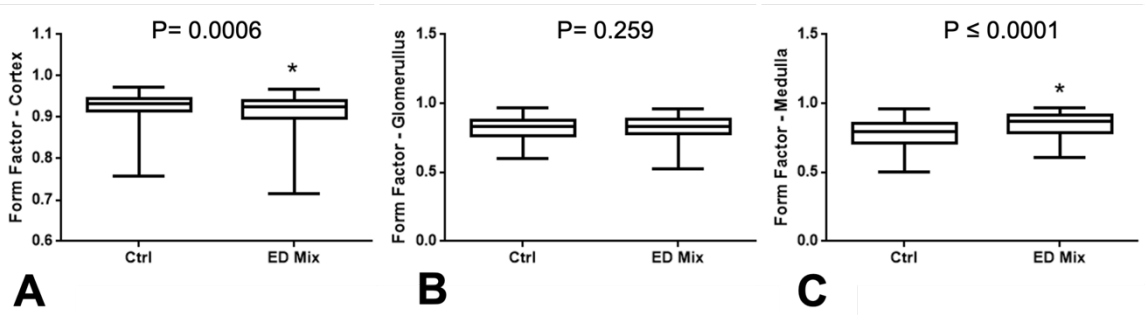
371

372

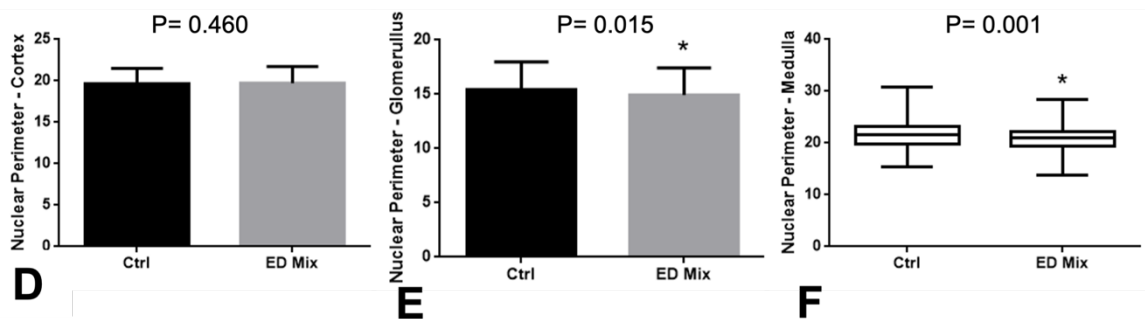
373

374

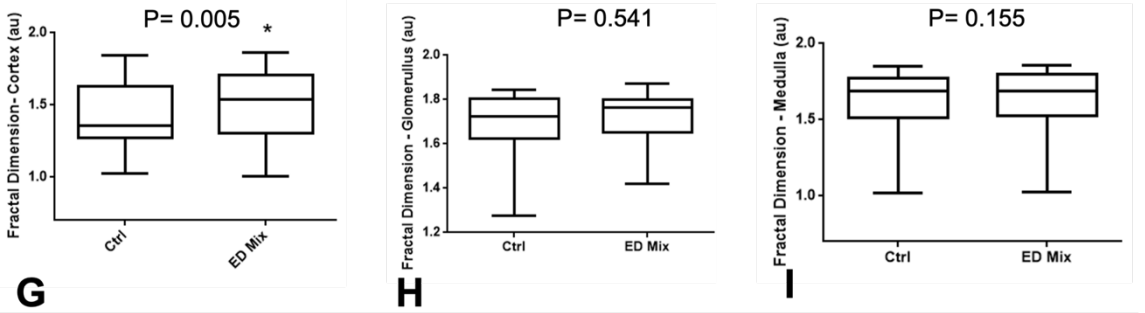
Karyometric Analysis



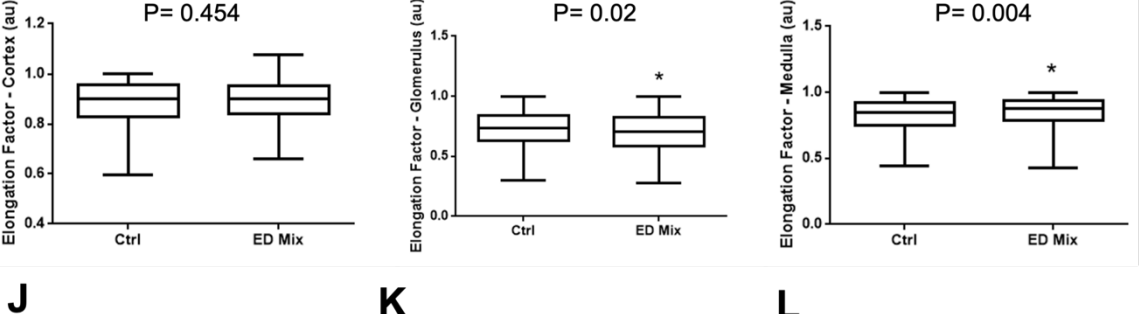
Nuclear Perimeter Analysis



Fractal Analysis



Elongation Factor Analysis



375

376

377

378 **Figura 4.** Representação gráfica da análise kariométrica (A, B, C), perímetro nuclear (D, E, F),
379 análise fractal (G, H, I), fator de alongamento (J, K, L). Resultados expressos em média \pm DP
380 (D e E, Teste t-student) ou mediana [intervalo interquartil] (A, B, C, F, G, H, I, J, K, L, Mann-
381 Whitney Test). * $p < 0,05$ em relação ao grupo Ctrl. (10 animais/grupo).

382

383 Quando as atenções são direcionadas ao estroma renal, verificou-se que a mistura
384 de DE induziu aumento na proporção de fibras de colágeno tipo I e tipo III em todos os
385 compartimentos avaliados (Figura 5).

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

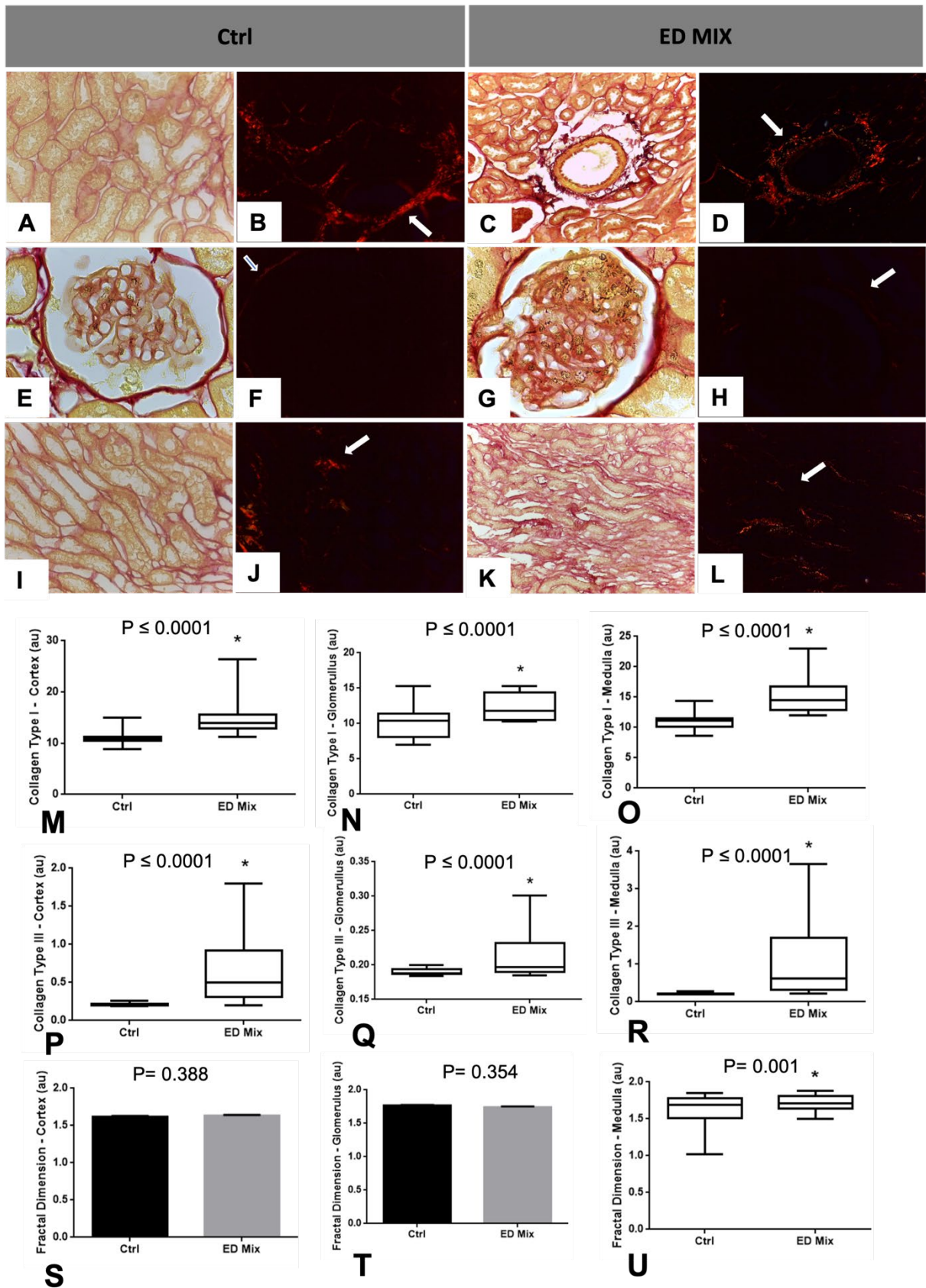
403

404

405

406

407



408

409 **Figura 5.** Secções histológicas de rim de ratos expostos durante a gestação, lactação e até a
 410 fase adulta à uma mistura de doze DE. Características morfológicas do estroma renal nos

411 grupos Ctrl (A e B - Córtex, E e F- Glomérulo, I e J- Medula) e Mistura DE (C e D- Córtex, G e
412 H- Glomérulo, K e L- Medula). Os gráficos representam a quantificação dos colágenos tipo I
413 (M, N, O) e tipo III (P, Q, R) e a dimensão fractal (S, T, U). Em M, N, O, P, Q, R, U os resultados
414 estão expressos como mediana [intervalo interquartil], Mann-Whitney Test. Em S, T os
415 resultados estão expressos como média \pm DP, T-Student Test. (10 animais/ grupo).
416 Ampliação 400x. Coloração: Picrossírius. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Ctrl.

417

418

419 **4. DISCUSSÃO**

420 O presente estudo, conduzido com o objetivo de avaliar um protocolo que mimetiza
421 a exposição humana à uma mistura de DE ao longo da vida, indicou a presença de alterações
422 celulares e teciduais no rim, alterando os fenótipos nucleares dos diferentes
423 compartimentos renais, além induzir fibrose renal, através da deposição de colágeno tipo I e
424 III.

425 A exposição ambiental a compostos químicos conjuntamente com fatores externos
426 (comportamento do ambiente e estilo de vida) interage com fatores internos (fisiologia,
427 idade, genética) bem como a resposta do corpo humano a esses fatores ao longo da vida,
428 constituindo o “exossoma” humano (Vineis et al., 2020). O impacto das exposições
429 ambientais na saúde de forma isolada é raro. A maioria da população está submetida a uma
430 mistura complexa de compostos químicos, que podem influenciar negativamente os
431 sistemas orgânicos, como no câncer, diabetes, obesidade, síndrome metabólica e
432 infertilidade (Coster et al., 2012). Poucos são os estudos experimentais que possuem
433 delineamentos que tentam mimetizar o conceito de exossoma, sobretudo quando se tem o
434 rim como foco do estudo.

435 Apesar do córtex e da medula renal possuírem particularidades morfológicas e
436 funcionais típicas, a avaliação compartimento-específica é negligenciada nos estudos. Na
437 região do córtex o suprimento de oxigênio e nutrientes é abundante, além de receber fluxo
438 sanguíneo em níveis superiores que a região medular. A medula é a porção que mais
439 contribui com a atividade metabólica, equanto que no córtex ocorre apenas uma pequena
440 fração da demanda metabólica devido ao grande volume ocupado pelos túbulos proximais.
441 Sendo assim a região medular é altamente susceptível a danos tóxicos, devido a sua alta taxa
442 metabólica e o suprimento de sangue ser relativamente mais baixo (Bankir et al, 2020).

443 Os dados biométricos não apresentaram diferenças significativas, demonstrando
444 condições de bem-estar normal sobre o animal. (Schimitt et al. 2000). Corroborando com

445 estes resultados, um estudo realizado por Yildiz et al. (2013), no qual os ratos foram
446 expostos durante 13 semanas ao BPA, não verificou alteração no peso relativo do rim. Por
447 outro lado, um estudo avaliando a administração de BPA por via oral durante 30 dias nas
448 doses de 120 ou 240 μ g/kg/dia verificou diminuição do peso absoluto e relativo do rim de
449 camundongos adultos, além de menor peso corpóreo (Sangai et al., 2012), sendo estas
450 alterações atribuídas à menor ingestão de alimentos, o que não foi verificado no nosso estudo
451 (dados não apresentados).

452 Há evidências crescentes da importância da morfometria nuclear como um
453 biomarcador do comportamento tumoral (François et al, 1999; Paraskevaku et al,1996). A
454 morfometria nuclear é um método de precisão, objetividade e reprodutividade para o
455 mesmo ou diferentes observadores (Monge et al, 1999). Os resultados encontrados nas
456 análises realizadas revelam variação significativa nos fenótipos nucleares entre os grupos
457 Ctrl e ED Mix e foram dependentes do compartimento analisado. A capacidade de uma de
458 uma célula alterar a forma do seu núcleo é uma característica de células migratórias,
459 característico de processos tumorais. O câncer é um campo de estudo no qual a forma
460 nuclear é de interesse, com estruturas nucleares anormais descritas e o aumento da
461 deformidade nuclear se correlaciona com o aumento do potencial metastático (Martewicz,
462 et al. 2022).

463 Com relação à análise kariométrica, resultados diferenciais foram observados na
464 medula e no córtex, indicando diminuição do fator forma no córtex e aumento na medula.
465 Evidências apontam que as alterações nucleares detectadas pela análise kariométrica são
466 um meio útil para quantificar a heterogeneidade de tumores (Henk et al. 1993). Nativ et al.
467 (1995), avaliando carcinomas renais não-metastáticos, observaram que a forma nuclear era,
468 isoladamente, o fator mais importante para prever a recorrência da neoplasia; no entanto
469 os tumores compostos por núcleos mais elípticos apresentavam pior prognóstico. Diante
470 disso, a presença de irregularidade nuclear obtida no presente estudo pode ser indício de
471 uma predisposição deste tecido à futuras alterações neoplásicas, principalmente na região
472 cortical.

473 Estudo realizado por Tosi et al. (1986) analisou o fenótipo nuclear de pacientes com
474 câncer renal de células claras. Neste estudo os autores chegaram à conclusão de que quanto

475 maior a área nuclear das células epiteliais renais, menor a sobrevida dos pacientes,
476 considerando tal parâmetro o melhor discriminador. Em outro estudo avaliando
477 adenocarcinoma renal, Eskelinen et al. (1993), acompanhando 135 pacientes por 9,5 anos,
478 afirmaram que fatores clínicos, histológicos e morfométricos estão significativamente inter-
479 relacionados, sendo que tumores metastáticos de alto grau possuem núcleos maiores, maior
480 variação no tamanho e forma nuclear. Em nosso estudo a área nuclear não apresentou
481 diferença em nenhum compartimento, possivelmente por conta da ausência de um processo
482 tumoral bem estabelecido.

483 A filtração é uma das mais importantes funções renais, sendo que hiperfiltração
484 glomerular é uma consequência em diversas patologias. Sugimoto et al. (1998), em seu
485 estudo com roedores, utilizando modelo de indução de diabetes por estreptozotocina,
486 observou aumento glomerular e consequente hiperfiltração glomerular nos estágios iniciais
487 da nefropatia diabética. Este achado é contrário ao nosso estudo, que revelou que o
488 tratamento não influenciou neste parâmetro, provavelmente em vista da baixa toxicidade
489 dos ED sobre o processo de filtração glomerular. A ação de tóxicos ambientais sobre os
490 glomérulos renais também foi avaliada por Yildiz et al. (2013), onde ratos machos que
491 receberam por via oral BPA durante 13 semanas nas doses de 125 ou 250µg/kg/dia não
492 apresentaram diferenças em relação à parâmetros glomerulares.

493 Sangai et al. (2012), ao avaliarem o rim de ratos expostos ao BPA nas doses de 120 e
494 240 mg/kg por 30 dias, identificaram alterações degenerativas, aumento da vacuolização,
495 desorganização do glomérulo e aumento do espaço entre o glomérulo e a parede da
496 cápsula. Os autores atribuem que tais alterações degenerativas podem ser resultado da
497 redução da capacidade antioxidante do rim. No presente estudo, observamos a presença de
498 vacuolização citoplasmática, necrose, congestão venosa, hemorragia, vacuolização nuclear,
499 infiltrado inflamatório, e presença de fusão tubular em todos os animais, não havendo
500 diferença entre os grupos. A vacuolização citoplasmática é a primeira alteração estrutural
501 renal observada nas intoxicações por xenobióticos e é reversível, mas sua persistência pode
502 levar à necrose tubular aguda e insuficiência renal (Hammer e McPhee 2019). A presença de
503 congestão de vasos sanguíneos, falta de fornecimento normal de oxigênio e nutrientes às
504 células, que acompanham o início da necrose tubular denota possível dano tubular e
505 tentativa de regeneração no grupo exposto (Kata, 2020).

506 Em nosso delineamento experimental optamos pela utilização do óleo de milho como
507 veículo para a administração da mistura de DE. Guerra et al. (2019) demonstraram os efeitos
508 da administração oral do óleo de milho na próstata, comumente utilizado com um
509 veículo de diluição das drogas, envolvendo toxicidade dos DE. Tais autores enfatizam que a
510 administração de tal veículo interferiu na homeostase e revelou seu potencial para atuar
511 como desregulador endócrino. O tratamento com o óleo de milho aumentou a expressão de
512 células positivas para receptores de estrogênio, resultando em alterações morfológicas na
513 próstata. Apesar do nosso foco de estudo seja o rim, o longo período de exposição pode ser
514 um fator que tenha predisposto os animais do grupo Ctrl às alterações encontradas.

515 A fibrose renal é uma extensão patológica do processo normal de cicatrização de
516 feridas, caracterizadas por lesões, inflamações, ativação e migração de miofibroblastos e
517 deposição e remodelação da matriz (Baues et al, 2020). Stanchev et al. (2020) evidenciaram
518 que o colágeno tipo I é uma proteína intersticial típica, sendo assim a fibrose renal é
519 caracterizada pelo aumento expressivo deste tipo de proteína. Porém outros colágenos
520 também se acumulam, incluindo o colágeno tipo III (Humphreys, 2017). No nosso estudo,
521 tanto o compartimento cortical, como medular e glomerular, apresentaram extensa
522 deposição de fibras de colágeno. Esse resultado vai de encontro à literatura, onde estudos
523 como os de Zhu et al (2017), no qual ratas prenhas que receberam di-n-butilfitalato (DBP)
524 nas doses de 850mg/kg/dia por perfusão oral durante o 14° ao 18° dia de gestação,
525 demonstrou que a ativação de fibroblastos renais por DBP leva à fibrose renal. Este fato
526 pode estar relacionado com a ideia proposta pelo estudo de Priego et al. (2021), que
527 administrou intraperitonealmente 120mg/kg/dia de BPA no período de 2 e 5 semanas em
528 camundongos, observando aumento de colágeno e fibronectina uma proteína da matriz
529 extracelular. Tais estudos, juntamente com nossos dados, suportam a hipótese de que
530 tóxicos ambientais são deletérios, através de processos profibróticos, que levam à
531 progressão do dano renal, em rins saudáveis.

532 Expressão exacerbada de enzima pró-oxidantes e abundância de espécies reativas de
533 oxigênio (ROS) têm sido diretamente ligados a danos nos podócitos, proteinúria,
534 glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial. Bosch-Panadero e colaboradores (2018),
535 demonstraram pela primeira vez que o Bisfenol A causa lesão mitocondrial, estresse
536 oxidativo e morte apoptótica em células tubulares. Dessa maneira, o BPA se assemelha a

537 toxinas uremicas podendo contribuir para a progressão da doença renal crônica (DRC). O
538 aumento de estresse oxidativo pode ser verificado desde os estágios iniciais da DRC,
539 possuindo um papel chave na patogênese da falência renal. Zhu et al. (2017), ao avaliarem a
540 exposição in vitro ao DBP, verificaram aumento do estresse oxidativo, além da redução da
541 expressão de genes responsáveis pela redução da atividade oxidativa de células renais. Em
542 nosso estudo, não observamos redução das atividades de superóxido dismutase, catalase,
543 glutaciona reduzida e glutaciona s-transferase. A utilização de doses ambientalmente
544 relevantes pode ser um fator que não tenha estimulado a geração de enzimas antioxidantes,
545 visto que o rim possui, naturalmente, grande densidade mitocondrial e alto consumo de
546 oxigênio, produzindo ROS em excesso (Coppolino et al, 2018). Além disso, associado ao
547 longo período de exposição promova a adaptação deste microambiente tecidual ao
548 ambiente.

549 Tendo em vista a saúde pública, este estudo propõe análises mais precisas do
550 impacto do ambiente desde a concepção até a morte sobre a histopatologia renal. Estudos
551 como este são importantes para criar melhores estratégias de prevenção e políticas públicas
552 centradas na relação homem/ambiente. A avaliação renal de maneira compartimento-
553 específica mostra uma grande evolução nos estudos envolvendo este órgão tão singular,
554 além de trazer novas perspectivas para pesquisas envolvendo exposições ambientais
555 múltiplas.

556

557 **5. CONCLUSÃO**

558 Sendo assim, a partir dos resultados obtidos, este estudo mostra que a
559 mistura de DE foi capaz de alterar o fenótipo nuclear de maneira compartimento-específica,
560 além de promover fibrose renal. Considerando os achados acima, pode-se inferir o potencial
561 da exposição ambiental em impactar a morfologia renal.

562

563 **6. CONFLITO DE INTERESSES**

564 Não há conflito de interesse para ser declarado.

565

566 **7. REFERÊNCIAS**

567

- 568 Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer H.-U., editor. *Methods of Enzymatic Analysis Methods of*
569 *Enzymatic Analysis Academic*. 105. 2nd ed. Elsevier Inc; 1974.
- 570
- 571 Aquino AM, Salata GC, Pinho CF, de Freitas ATAG, Périco LL, de Lion Siervo GEM, Mendes LO,
572 Da Cunha De Medeiros P, Justulin LA, Fernandes GSA, Perobelli JE, Scarano WR. Arsenic
573 exposure during prepuberty alters prostate maturation in pubescent rats. *Reprod Toxicol*.
574 2019 Oct;89:136-144. doi: 10.1016/j.reprotox.2019.07.010.
- 575
- 576 Ashari S, Karami M, Shokrzadeh M, Ghandadi M, Ghassemi-Barghi N, Dashti A, Ranaee M,
577 Mohammadi H. The implication of mitochondrial dysfunction and mitochondrial oxidative
578 damage in di (2-ethylhexyl) phthalate induced nephrotoxicity in
579 both in vivo and in vitro models. *Toxicol Mech Methods*. 2020 Jul;30(6):427-437. doi:
580 10.1080/15376516.2020.1758980
- 581
- 582 Axelstad M, Christiansen S, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, Isling LK, Kortenkamp A, Hass
583 U (2014) Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental
584 effects in preweaning rats. *Reproduction* 147(4):489-501. doi: 10.1530/REP-13-0447
- 585
- 586 Bankir L, Figueres L, Prot-Bertoye C, Bouby N, Crambert G, Pratt JH, Houillier P. Medullary
587 and cortical thick ascending limb: similarities and differences. *Am J Physiol Renal Physiol*.
588 2020 Feb 1;318(2):F422-F442. doi: 10.1152/ajprenal.00261.2019
- 589
- 590 Baues M, Klinkhammer BM, Ehling J, Gremse F, van Zandvoort MAMJ, Reutelingsperger
591 CPM, Daniel C, Amann K, Bábíčková J, Kiessling F, Floege J, Lammers T, Boor P. A collagen-
592 binding protein enables molecular imaging of kidney fibrosis in vivo. *Kidney Int*. 2020
593 Mar;97(3):609-614. doi: 10.1016/j.kint.2019.08.029
- 594
- 595 Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, et al. State of the Science of Endocrine Disrupting
596 Chemicals 2012: An Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors Prepared
597 by a Group of Experts for the United Nations Environment Program and World Health
598 Organization. World Health Organization; 2013.
- 599

- 600 Boberg J, Johansson HK, Hadrup N, Dreisig K, Berthelsen L, Almstrup K, Vinggaard AM, Hass
601 U (2015) Perinatal exposure to mixtures of anti-androgenic chemicals causes proliferative
602 lesions in rat prostate. *Prostate* 75(2):126-40. doi: 10.1002/pros.22897
603
- 604 Bosch-Panadero E, Mas S, Civantos E, Abaigar P, Camarero V, Ruiz-Priego A, Ortiz A, Egido J,
605 González-Parra E. O bisfenol A é uma toxina exógena que promove lesão e morte
606 mitocondrial nas células tubulares. *Environ Toxicol.* 2018 Mar;33(3):325-332. doi:
607 10.1002/tox.22519.
- 608 Coppolino G, Leonardi G, Andreucci M, Bolignano D. Oxidative Stress and Kidney Function: A
609 Brief Update. *Curr Pharm Des.* 2018;24(40):4794-4799. doi:
610 10.2174/1381612825666190112165206.
- 611 Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, Faust M,
612 Lichtensteiger W, Schlumpf M, Burdorf A, Hass U (2012) Mixtures of endocrine disrupting
613 contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J*
614 *Androl* 35(3):303-16. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01242.x
615
- 616 De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and
617 mechanisms of action. *J Environ Public Health.* 2012;2012:713696. doi:
618 10.1155/2012/713696
- 619 ECHA 2010. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter
620 R.8: Characterization of dose [concentration]-response for human health.
- 621 Eskelinen M, Lipponen P, Aitto-Oja L, Hall O, Syrjänen K. The value of histoquantitative
622 measurements in prognostic assessment of renal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 1993 Oct
623 21;55(4):547-54. doi: 10.1002/ijc.2910550405
- 624 Franchi FF, Hernandez MP, Ferreira ALC, de Lima VAV, Mendes LO, Aquino AM, Scarano WR,
625 Castilho ACS (2020) Fractal analysis and histomolecular phenotyping provides insights into
626 extracellular matrix remodeling in the developing bovine fetal ovary. *Biochem Biophys Res*
627 *Commun* 523(4):823-828. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.025

- 628 François C, Decaestecker C, Petein M, van Ham P, Peltier A, Pasteels JL, Danguy A, Salmon I,
629 van Velthoven R, Kiss R. Classification strategies for the grading of renal cell carcinomas,
630 based on nuclear morphometry and densitometry. *J Pathol.* 1997 Oct;183(2):141-50. doi:
631 10.1002/(SICI)1096-9896(199710)183:2<141::AID-PATH916>3.0.CO;2-0
- 632 Guerra LHA, Tamarindo GH, de Campos SGP, Taboga SR, Vilamaior PSL. Do mineral and corn
633 oil serve as potential endocrine disruptors in the gerbil prostate? *Reprod Toxicol.* 2019
634 Dec;90:141-149. doi: 10.1016/j.reprotox.2019.09.004
- 635 Holland N. Future of environmental research in the age of epigenomics and exposomics. *Rev*
636 *Environ Health.* 2017 Mar 1;32(1-2):45-54. doi: 10.1515/reveh-2016-0032.
- 637 Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, Mandrup KR, Axelstad M, Christiansen S, Vinggaard AM,
638 Taxvig C, Kortenkamp A, Hass U (2014) Late-life effects on rat reproductive system after
639 developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters. *Reproduction* 147(4):465-76.
640 doi: 10.1530/REP-13-0448
- 641 Johansson HK, Jacobsen PR, Hass U, Svingen T, Vinggaard AM, Isling LK, Axelstad M,
642 Christiansen S, Boberg J (2016) Perinatal exposure to mixtures of endocrine disrupting
643 chemicals reduces female rat follicle reserves and accelerates reproductive aging. *Reprod*
644 *Toxicol* 61:186-94. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.03.045
- 645
- 646 Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by
647 Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1978 Jun;41(3):267-74. doi:
648 10.1679/aohc1950.41.267.
- 649
- 650 Kataria A, Trasande L, Trachtman H. The effects of environmental chemicals on renal
651 function. *Nat Rev Nephrol.* 2015 Oct;11(10):610-25. doi: 10.1038/nrneph.2015.94.
- 652
- 653 Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac
654 MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HÁ (1996)
655 Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine
656 disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl
657 4(Suppl 4):715-40. doi: 10.1289/ehp.96104s4715

- 658 Liang F, Yan B. Oxidative damage in the liver and kidney induced by dermal exposure to
659 diisononyl phthalate in Balb/c mice. *Toxicol Ind Health*. 2020 Jan;36(1):30-40. doi:
660 10.1177/0748233719900861
661
- 662 Mandrup KR, Johansson HK, Boberg J, Pedersen AS, Mortensen MS, Jørgensen JS, Vinggaard
663 AM, Hass U (2015) Mixtures of environmentally relevant endocrine disrupting chemicals
664 affect mammary gland development in female and male rats. *Reprod Toxicol* 54:47-57. doi:
665 10.1016/j.reprotox.2014.09.016
666
- 667 Martewicz S, Zhu X, Qu S, Cui M, Grespan E, Luni C, Jiang B, Yang G, Elvassore N. Micropillar-
668 based phenotypic screening platform uncovers involvement of HDAC2 in nuclear
669 deformability. *Biomaterials*. 2022 Jul;286:121564. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121564
670
- 671 Miller GW, Jones DP. The nature of nurture: refining the definition of the exposome. *Toxicol*
672 *Sci*. 2014 Jan;137(1):1-2. doi: 10.1093/toxsci/kft251.
673
- 674 Monge JM, Val-Bernal JF, Buelta L, García-Castrillo L, Asensio L. Selective nuclear
675 morphometry as a prognostic factor of survival in renal cell carcinoma. *Histol Histopathol*.
676 1999 Jan;14(1):119-23. doi: 10.14670/HH-14.119
677
- 678 Monneret C. What is an endocrine disruptor? *C R Biol*. 2017 Sep-Oct;340(9-10):403-405. doi:
679 10.1016/j.crv.2017.07.004.
680
- 681 Montes GS, Krisztán RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourão PA, Junqueira LC. Histochemical
682 and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry*. 1980 Feb;65(2):131-
683 41. doi: 10.1007/BF00493161.
- 684 Nativ O, Sabo E, Raviv G, Medalia O, Moskovitz B, Goldwasser B. The role of nuclear
685 morphometry for predicting disease outcome in patients with localized renal cell carcinoma.
686 *Cancer*. 1995 Oct 15;76(8):1440-4. doi: 10.1002/1097-0142(19951015)76:8<1440::aid-
687 cncr2820760822>3.0.co;2-8.

- 688 Paraskevskou E, Kavantzias N, Pavlopoulos PM, Delibasis A, Yova D, Davaris P. Computerized
689 nuclear morphometry of renal cell carcinomas. *Gen Diagn Pathol.* 1996 Oct;142(2):101-4
- 690 Pawar NN, Badgajar PC, Sharma LP, Telang AG, Singh KP. Oxidative impairment and
691 histopathological alterations in kidney and brain of mice following subacute lambda-
692 cyhalothrin exposure. *Toxicol Ind Health.* 2017 Mar;33(3):277-286. doi:
693 10.1177/0748233715627736
- 694 Priego AR, Parra EG, Mas S, Morgado-Pascual JL, Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S. Bisphenol
695 A Modulates Autophagy and Exacerbates Chronic Kidney Damage in Mice. *Int J Mol Sci.* 2021
696 Jul 3;22(13):7189. doi: 10.3390/ijms22137189
- 697 Rappaport SM, Smith MT (2010) *Epidemiology. Environment and disease risks. Science*
698 330(6003):460-1. doi: 10.1126/science.1192603
- 699 S Kata F. Short-time Effects of Malathion Pesticide on Functional and Histological Changes of
700 Liver and Kidney in Female Mice. *Pak J Biol Sci.* 2020 Jan;23(9):1103-1112. doi:
701 10.3923/pjbs.2020.1103.1112
- 702 Sangai NP, Verma RJ, Trivedi MH. Testing the efficacy of quercetin in mitigating bisphenol A
703 toxicity in liver and kidney of mice. *Toxicol Ind Health.* 2014 Aug;30(7):581-97. doi:
704 10.1177/0748233712457438.
- 705 Sato M, Wada K, Marumo H, Nagao T, Imai K, Ono H. Influence of corn oil and diet on
706 reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 2000 Jul;56(1):156-
707 64. doi: 10.1093/toxsci/56.1.156.
- 708 Shi R, Liu Z, Liu T. The antagonistic effect of bisphenol A and nonylphenol on liver and kidney
709 injury in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2021 Oct;43(5):527-535. doi:
710 10.1080/08923973.2021.1950179
- 711 Siervo GE, Vieira HR, Ogo FM, Fernandez CD, Gonçalves GD, Mesquita SF, Anselmo-Franci JA,
712 Cecchini R, Guarnier FA, Fernandes GS. Spermatic and testicular damages in rats exposed to
713 ethanol: influence of lipid peroxidation but not testosterone. *Toxicology.* 2015 Apr 1;330:1-
714 8. doi: 10.1016/j.tox.2015.01.016.

- 715 Stanchev S, Stamenov N, Kirkov V, Dzhambazova E, Nikolov D, Paloff A. Differential collagen
716 expression in kidney and heart during hypertension. *Bratisl Lek Listy*. 2020;121(1):73-78. doi:
717 10.4149/BLL_2020_011
- 718 Sugimoto H, Shikata K, Matsuda M, Kushiro M, Hayashi Y, Hiragushi K, Wada J, Makino H.
719 Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (ecNOS) in afferent and
720 glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic
721 nephropathy. *Diabetologia*. 1998 Dec;41(12):1426-34. doi: 10.1007/s001250051088
- 722 Sümer E, Senturk GE, Demirel ÖU, Yesilada E. Comparative biochemical and
723 histopathological evaluations proved that receptacle is the most effective part of *Cynara*
724 *scolymus* against liver and kidney damages. *J Ethnopharmacol*. 2020 Mar 1;249:112458. doi:
725 10.1016/j.jep.2019.112458
- 726 Taboga SR, Santos AB, Rocha A, Vidal BC, Mello MLS (2003) Nuclearphenotypes and
727 morphometry of human secretoty prostatic cells: acomparative study of benign and
728 malignant lesions in Brazilianpatients.*Caryologia* 56:313–320
- 729 Tambasco M, Costello BM, Kouznetsov A, Yau A, Magliocco AM. Quantifying the
730 architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron*. 2009
731 Jun;40(4):486-94. doi: 10.1016/j.micron.2008.12.004.
- 732 Tosi P, Luzi P, Baak JP, Miracco C, Santopietro R, Vindigni C, Mattei FM, Acconcia A, Massai
733 MR. Nuclear morphometry as an important prognostic factor in stage I renal cell carcinoma.
734 *Cancer*. 1986 Dec 1;58(11):2512-8. doi: 10.1002/1097-0142(19861201)58:11<2512::aid-
735 cncr2820581126>3.0.co;2-o.
- 736 Van der Poel HG, Mulders PF, Oosterhof GO, Schaafsma HE, Hendriks JC, Schalken JA,
737 Debruyne FM. Prognostic value of karyometric and clinical characteristics in renal cell
738 carcinoma. Quantitative assessment of tumor heterogeneity. *Cancer*. 1993 Nov
739 1;72(9):2667-74. doi: 10.1002/1097-0142(19931101)72:9<2667::aid-
740 cncr2820720924>3.0.co;2-0.
- 741 Vineis P, Robinson O, Chadeau-Hyam M, Dehghan A, Mudway I, Dagnino S. What is new in
742 the exposome? *Environ Int*. 2020 Oct;143:105887. doi: 10.1016/j.envint.2020.105887

- 743 Wu CT, Wang CC, Huang LC, Liu SH, Chiang CK. Plasticizer Di-(2-Ethylhexyl)Phthalate Induces
744 Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Renal Fibrosis In Vitro and In Vivo. *Toxicol Sci.*
745 2018 Jul 1;164(1):363-374. doi: 10.1093/toxsci/kfy094.
- 746 Yildiz N, Barlas N. Hepatic and renal functions in growing male rats after bisphenol A and
747 octylphenol exposure. *Hum Exp Toxicol.* 2013 Jul;32(7):675-86. doi:
748 10.1177/0960327112464796.
- 749 Zhu YP, Chen L, Wang XJ, Jiang QH, Bei XY, Sun WL, Xia SJ, Jiang JT. Maternal exposure to di-
750 n-butyl phthalate (DBP) induces renal fibrosis in adult rat offspring. *Oncotarget.* 2017 May
751 9;8(19):31101-31111. doi: 10.18632/oncotarget.16088

ANEXO 1- PARECER FINAL DO COMITÊ ACESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL E COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS

22/11/2021 02:04

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPD - Projeto de Pesquisa Docente

Parecer Final

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

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

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

ANEXO 2- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA 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* 341:325–329

- Article by DOI

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

- Book

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

- Book chapter

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

- Online document

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

- Dissertation

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

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

ISSN LTWA

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

Specific Remarks

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

Statements & Declarations

The following statements must be included in your submitted manuscript under the heading 'Statements and Declarations'. This should be placed after the References section. Please

note that submissions that do not include required statements will be returned as incomplete.

Funding

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

Example statements:

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

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

Competing Interests

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

Example statements:

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

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

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

Author Contributions

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

Example statement:

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

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

Tables

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

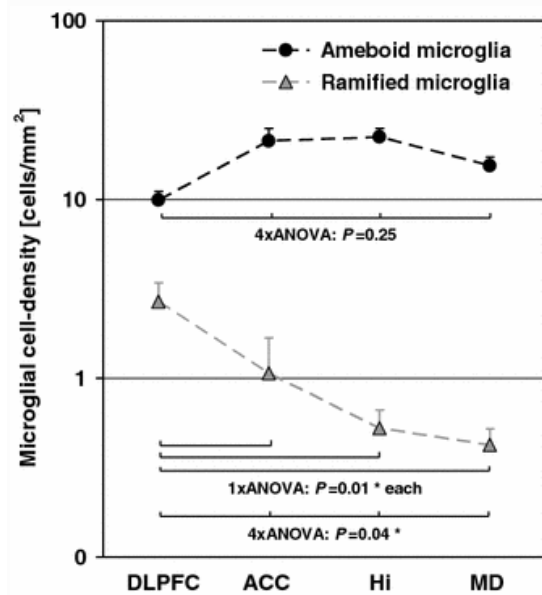
Artwork

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

Electronic Figure Submission

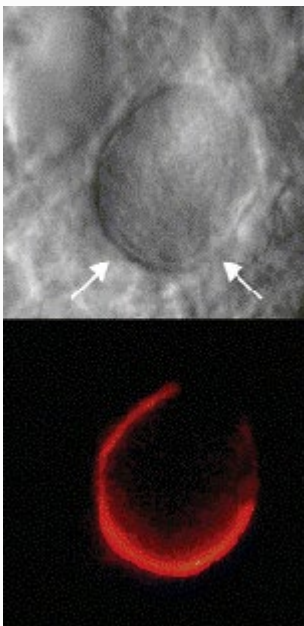
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the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

Line Art



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

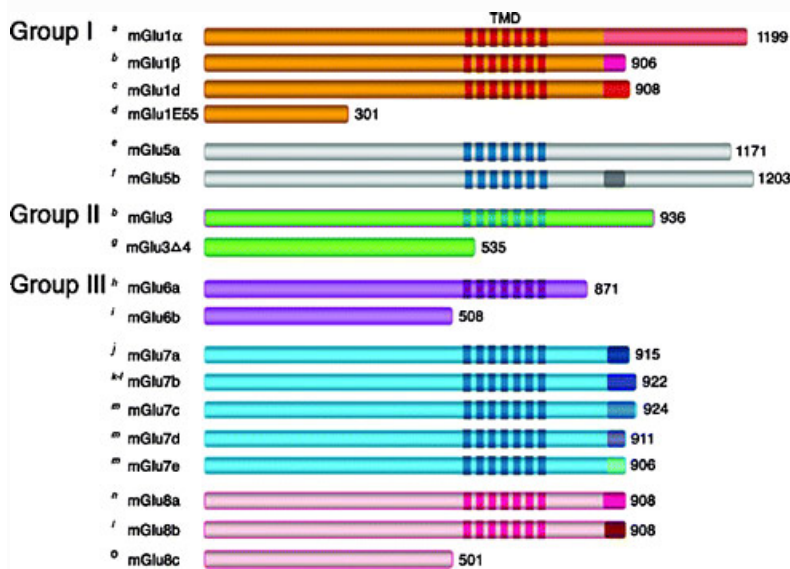
Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



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

Color Art

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

Figure Lettering

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

Figure Numbering

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

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

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

Figure Placement and Size

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

Permissions

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

Accessibility

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

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

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This

feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

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

Submission

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

Audio, Video, and Animations

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

Text and Presentations

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

Spreadsheets

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

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .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 Wand owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.

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

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

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

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

Non-financial interests: none.

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

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

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

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

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

Research Data Policy

This journal operates a [type 1 research data policy](#). The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public

repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

List of Repositories

Research Data Policy

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

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

DataCite

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

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

After Acceptance

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

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

Article publishing agreement

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

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

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

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

Online First

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

Open Choice

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

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

Benefits:

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

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

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

[Open Choice](#)

[Funding and Support pages](#)

Copyright and license term – CC BY

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

[Find more about the license agreement](#)

Open access publishing

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