



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

PEDRO MEIRA DOLFINI

**INFLUÊNCIA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MICROAMBIENTE
RENAL DE RATOS DURANTE O ENVELHECIMENTO: ASPECTOS
HISTOPATOLÓGICOS**

Presidente Prudente – SP
2024



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

PEDRO MEIRA DOLFINI

**INFLUÊNCIA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MICROAMBIENTE
RENAL DE RATOS DURANTE O ENVELHECIMENTO: ASPECTOS
HISTOPATOLÓGICOS**

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

Orientador:
Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

616.61 Dolfini, Pedro Meira
D663i Influência de desreguladores endócrinos no
microambiente renal de ratos durante o envelhecimento:
aspectos histopatológicos \ Pedro Meira Dolfini; orientador
Leonardo de Oliveira Mendes. -- Presidente Prudente,
2024.
42 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2024.
Bibliografia.

1. Nefropatias. 2. Disruptores Endócrinos. 3. Efeitos
Tardios da Exposição Pré-Natal. I. Mendes, Leonardo de
Oliveira, orient. II. Título.

PEDRO MEIRA DOLFINI

**INFLUÊNCIA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MICROAMBIENTE
RENAL DE RATOS DURANTE O ENVELHECIMENTO: ASPECTOS
HISTOPATOLÓGICOS**

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

Presidente Prudente, 29 de agosto de 2024

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Renata Calciolari Rossi
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof^a. Dr^a. Debora Tavares de Resende e Silva
Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS
Chapecó - SC

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Silmar e Maria Inês por sempre me apoiarem, inspirarem e possibilitarem minha dedicação integral aos estudos ao longo da vida.

A minha esposa Caroline que com seu amor e sua dedicação tornou cada etapa desse trabalho mais leve.

Aos meus irmãos Mariana, André e Clara pela cumplicidade e apoio.

Ao Professor Leonardo de Oliveira Mendes pelos auxílio, ensinamentos e paciência que tornaram possível a realização deste trabalho.

À Kariane Delalibera Hinokuma pela parceria, suporte e auxílio.

Agradeço também aos demais professores do departamento de pós graduação de Universidade do Oeste Paulista.

“Se o Senhor não edificar a casa, em vão trabalham os que a edificam; se o Senhor não guardar a cidade, em vão vigia a sentinela”

(Salmo 127)

RESUMO

Influência de desreguladores endócrinos no microambiente renal de ratos durante o envelhecimento: aspectos histopatológicos

Os rins são órgãos essenciais para diversas funções homeostáticas, porém são vulneráveis a danos causados por exposição a produtos químicos ambientais, especialmente desreguladores endócrinos (DE). Esses compostos podem interferir no sistema endócrino e estão associados a uma série de efeitos adversos à saúde, incluindo lesões renais e nefrotoxicidade. A exposição a DE durante o desenvolvimento fetal é particularmente preocupante, pois pode levar a modificações estruturais e funcionais duradouras nos rins, predispondo a doenças renais na vida adulta. Assim, o objetivo do estudo foi caracterizar os efeitos da exposição perinatal a uma mistura de DE sobre a histoarquitetura renal. Fêmeas prenhas da linhagem Sprague-Dawley foram divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: Grupo Controle: receberam veículo (óleo de milho, 2 ml/kg, por gavagem) e Grupo ED Mix: receberam 32,11 mg/kg/dia da mistura constituída de doze compostos (ftalatos, pesticidas, filtros u.v., bisfenol A, butilparabeno) diluídos em óleo de milho (2 ml/kg), por gavagem. As ratas prenhas ou lactentes recebem o tratamento do dia gestacional 7 (DG7) até o dia pós-natal 21 (DPN21). Após o desmame, no DPN22, os filhotes ficaram alojados até os 440 dias de idade recebendo água e ração *ad libitum*, 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. A mistura de DE não alterou o índice organo-somático e peso absoluto do rim. Nos animais expostos à mistura foram observadas lesões como necrose e fusão tubular verificando uma tendência biológica ($p = 0,068$) para um maior número de alterações patológicas no grupo exposto. Verificou-se aumento do perímetro nuclear e a presença de núcleos maiores no córtex ($p < 0,0001$) e na medula ($p = 0,003$) de animais expostos à mistura, além de alteração no padrão de organização celular nas regiões glomerulares ($p < 0,0001$) e medular ($p = 0,0018$) destes animais. A exposição à mistura de DE alterou o padrão de organização do colágeno renal, aumentou a fibrose representada pelo aumento do colágeno I e III nos compartimentos cortical e medular ($p < 0,0001$) e

reduziu a quantidade no glomérulo ($p < 0,0001$). Esses achados sugerem que a exposição perinatal a DE pode alterar a histoarquitetura do microambiente renal durante o envelhecimento, indicando que o ambiente pode impactar na função renal e a saúde ao longo da vida.

Palavras-chave: Nefropatia, Desreguladores endócrinos, Efeitos retardados da exposição pré-natal.

ABSTRACT

Influence of perinatal exposure to an endocrine disruptor mixture on the renal microenvironment in aged rats: histopathological aspects

The kidneys are essential organs for several homeostatic functions, but they are vulnerable to damage caused by exposure to environmental chemicals, especially endocrine disruptors (ED). These compounds can interfere with the endocrine system and are associated with a number of adverse health effects, including kidney injury and nephrotoxicity. Exposure to ED during fetal development is of particular concern because it can lead to long-lasting structural and functional changes in the kidney, predisposing to kidney disease in adulthood. Therefore, the aim of this study was to characterize the effects of perinatal exposure to a mixture of ED on renal histoarchitecture. Pregnant Sprague-Dawley rats were randomly divided into 2 experimental groups: Control Group (vehicle: corn oil, by gavage) and ED Mix Group: received 32.11 mg/kg/day of the mixture consisting of twelve compounds (phthalates, pesticides, UV filters, bisphenol A, butylparaben) diluted in corn oil (2 ml/kg), by gavage. Pregnant or lactating rats received treatment from gestational day 7 (GD7) to postnatal day 21 (PND21). After weaning, on PND22, the pups were housed until 440 days of age receiving water and food ad libitum, when they were euthanized. The kidney was collected, dissected and processed for histological analysis. Sections stained with hematoxylin-eosin and picrosirius were subjected to fractal analysis, karyometric analysis, glomerular volume analysis, nuclear perimeter, elongation factor and quantification of collagen types. The DE mixture did not alter the organosomatic index and absolute weight of the kidney. In the animals exposed to the mixture, lesions such as necrosis and tubular fusion were observed, verifying a biological tendency ($p = 0.068$) for a greater number of histological alterations in the exposed group. An increase in the nuclear perimeter and the presence of larger nuclei were observed in the cortex ($p < 0.5$) and medulla ($p = 0,003$) of animals exposed to the mixture, in addition to changes in the pattern of cellular organization in the glomerular and medullary regions of these animals. Exposure to the DE mixture altered the pattern of renal collagen organization, increased fibrosis represented by the increase in collagen I and III in the cortical and medullary compartments ($p < 0.0001$) and reduced the

amount in the glomerulus. These findings suggest that perinatal exposure to ED may significantly affect the histoarchitecture of the renal microenvironment during aging, indicating that the environment may impact renal function and health across the lifespan.

Keywords: Nephropathy; Endocrine disruptors; Prenatal exposure delayed effects.

LISTA DE SIGLAS

%	- Porcentagem
<	- Menor
±	- Mais ou menos
°C	- Graus Celsius
4-MBC	- 4-metil-benzidileno cânfora
BPA	- Composto Fenólico Bisfenol A
CAP	- Comitê de Assessor de Pesquisa Institucional
CAS	- <i>Chemical Abstracts Service</i>
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	- Centímetro
DAG	- Distância Anogenital
DBP	- di-n-butil ftalato
DDT	- Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DE	- Desreguladores Endócrinos
DEHP	- Di-(2-etilexil) ftalato
DF	- Dimensão Fractal
DG	- Dia Gestacional
DOHad	- <i>Developmental origins of health and disease</i>
DPN	- Dia pós-natal
DRC	- Doença Renal Crônica
EPA	- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
g	- Grama
h	- Hora
HE	- Hematoxilina - Eosina
kg	- Quilograma
Log	- Logaritmo
mL	- Mililitros
n	- Número
NIH	- Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos
OMC	- Metoxinamato de Octila
OMS	- Organização Mundial de Saúde
p,p'	- DDE - Diclorodifenil-dicloroetileno
RGB	- Red, Green e Blue
SD	- Sprague-Dawley
U.V.	- Radiação ultravioleta
x	- Vezes
µm	- Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do delineamento experimental.....	21
Figura 2 - Secções histológicas e escore histopatológico no rim de ratos expostos a uma mistura de DE durante a gestação e lactação..	26
Figura 3 - Secções histológicas de diferentes compartimentos renais (córtex, glomérulo e medula).....	27
Figura 4 - Representação gráfica da análise kariométrica (A, B, C), perímetro nuclear (D, E, F), análise fractal (G, H, I), fator de alongamento (J, K, L).....	28
Figura 5 - Secções histológicas de glomérulos de ratos expostos durante a gestação e lactação, a uma mistura de doze DE.....	30
Figura 6 - Secções histológicas e quantificação de colágeno no rim de rato expostos durante a gestação e lactação a uma mistura de doze DE.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da mistura e consumo humano individual ajustado de DE.....	20
Tabela 2 - Dados biométricos da prole de ratos expostos durante a gestação e lactação à uma mistura de DE baseada na exposição humana.....	24
Tabela 3 - Escore histopatológico de ratos expostos à mistura de DE na gestação e lactação.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1	Animais e ambiente de experimentação.....	18
2.2	Mistura de DE.....	19
2.3	Delineamento experimental	20
2.4	Índice Organo-Somático	21
2.5	Análise da estrutura renal.....	22
2.5.1	Análise Histopatológica.....	22
2.5.2	Análise Kariométrica	23
2.5.3	Análise Fractal	23
2.5.4	Análise do Volume Glomerular	23
2.5.5	Análise Perímetro Nuclear e Fator de Alongamento.....	24
2.5.6	Quantificação dos Colágenos tipo I e tipo III.....	24
2.6	Análise estatística	24
3	RESULTADOS	33
4	DISCUSSÃO	36
5	CONCLUSÕES	36
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO	40

**INFLUÊNCIA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MICROAMBIENTE
RENAL DE RATOS DURANTE O ENVELHECIMENTO: ASPECTOS
HISTOPATOLÓGICOS**

Pedro Meira Dolfini¹, Karianne Delalibera Hinokuma², Leonardo de Oliveira Mendes^{1,2}

¹ Mestrado em Ciências da Saúde - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Leonardo de Oliveira Mendes Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

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

Email: leobio85@gmail.com

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Journal of Developmental Origins of Health and Disease, Fator de impacto: 1.7; Qualis: A3

RESUMO

Os rins são órgãos essenciais para diversas funções homeostáticas, porém são vulneráveis a danos causados por exposição a produtos químicos ambientais, especialmente desreguladores endócrinos (DE). Esses compostos podem interferir no sistema endócrino e estão associados a uma série de efeitos adversos à saúde, incluindo lesões renais e nefrotoxicidade. A exposição a DE durante o desenvolvimento fetal é particularmente preocupante, pois pode levar a modificações estruturais e funcionais duradouras nos rins, predispondo a doenças renais na vida adulta. Assim, o objetivo do estudo foi caracterizar os efeitos da exposição perinatal a uma mistura de DE sobre a histoarquitetura renal. Fêmeas prenhas da linhagem Sprague-Dawley foram divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: Grupo Controle: receberam veículo (óleo de milho, 2ml/kg, 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 prenhas ou lactentes recebem o tratamento do dia gestacional 7 (DG7) até o dia pós-natal 21 (DPN21). Após o desmame, no DPN22, os filhotes ficaram alojados até os 440 dias de idade recebendo água e ração *ad libitum*, 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. A mistura de DE não alterou o índice organo-somático e peso absoluto do rim. Nos animais expostos à mistura foram observadas lesões como necrose e fusão tubular verificando uma tendência biológica ($p = 0,068$) para um maior número de alterações patológicas no grupo exposto. Verificou-se aumento do perímetro nuclear e a presença de núcleos maiores no córtex ($p < 0,0001$) e na medula ($p = 0,003$) de animais expostos à mistura, além de alteração no padrão de organização celular nas regiões glomerulares ($p < 0,0001$) e medular ($p = 0,0018$) destes animais. A exposição à mistura de DE alterou o padrão de organização do colágeno renal, aumentou a fibrose representada pelo aumento do colágeno I e III nos compartimentos cortical e medular ($p < 0,0001$) e reduziu a quantidade no glomérulo ($p < 0,0001$). Esses achados sugerem que a exposição perinatal a DE pode alterar a histoarquitetura do microambiente renal durante o envelhecimento, indicando que o ambiente pode impactar na função renal e a saúde ao longo da vida.

Palavras-chave: Nefropatia, Desreguladores endócrinos, Efeitos retardados da exposição pré natal.

ABSTRACT

The kidneys are essential organs for several homeostatic functions, but they are vulnerable to damage caused by exposure to environmental chemicals, especially endocrine disruptors (ED). These compounds can interfere with the endocrine system and are associated with a number of adverse health effects, including kidney injury and nephrotoxicity. Exposure to ED during fetal development is of particular concern because it can lead to long-lasting structural and functional changes in the kidney, predisposing to kidney disease in adulthood. Therefore, the aim of this study was to characterize the effects of perinatal exposure to a mixture of ED on renal histoarchitecture. Pregnant Sprague-Dawley rats were randomly divided into 2 experimental groups: Control Group (vehicle: corn oil, by gavage) and ED Mix Group: received 32.11 mg/kg/day of the mixture consisting of twelve compounds (phthalates, pesticides, UV filters, bisphenol A, butylparaben) diluted in corn oil (2 ml/kg), by gavage. Pregnant or lactating rats received treatment from gestational day 7 (GD7) to postnatal day 21 (PND21). After weaning, on PND22, the pups were housed until 440 days of age receiving water and food ad libitum, when they were euthanized. The kidney was collected, dissected and processed for histological analysis. Sections stained with hematoxylin-eosin and picrosirius were subjected to fractal analysis, karyometric analysis, glomerular volume analysis, nuclear perimeter, elongation factor and quantification of collagen types. The DE mixture did not alter the organosomatic index and absolute weight of the kidney. In the animals exposed to the mixture, lesions such as necrosis and tubular fusion were observed, verifying a biological tendency ($p = 0.068$) for a greater number of histological alterations in the exposed group. An increase in the nuclear perimeter and the presence of larger nuclei were observed in the cortex ($p < 0.5$) and medulla ($p = 0,003$) of animals exposed to the mixture, in addition to changes in the pattern of cellular organization in the glomerular and medullary regions of these animals. Exposure to the DE mixture altered the pattern of renal collagen organization, increased fibrosis represented by the increase in collagen I and III in the cortical and medullary compartments ($p < 0.0001$) and reduced the amount in the glomerulus. These findings suggest that perinatal exposure to ED may significantly affect the histoarchitecture of the renal microenvironment during aging, indicating that the environment may impact renal function and health across the lifespan.

Keywords: Nephropathy; Endocrine disruptors; Prenatal exposure delayed effects.

1. INTRODUÇÃO

Os rins apresentam várias funções homeostáticas essenciais. Essas funções incluem a remoção de resíduos, o equilíbrio de fluidos eletrólitos, o equilíbrio metabólico ácido-base do sangue, bem como a produção e modificação de hormônios para pressão sanguínea, homeostase de cálcio, potássio e estímulo à produção de glóbulos vermelhos ¹.

Conforme revisado por Kataria *et al.* ², diversos estudos documentaram os efeitos adversos renais que ocorrem em resposta à exposição gradual a uma ampla gama de produtos químicos ambientais ². Existem evidências de que alguns desses produtos químicos, denominados desreguladores endócrinos (DE), podem levar a lesões renais, dano oxidativo mitocondrial e nefrotoxicidade ³. Em uma revisão feita por Schug *et al.* ⁴ é possível concluir que a exposição a inúmeros DE em seres humanos está intimamente relacionada com o surgimento de doenças na prole e nas gerações subsequentes.

Em seres humanos e animais a desregulação endócrina é um mecanismo de efeito relacionado ao funcionamento do sistema endócrino. Os DE podem agir de inúmeras maneiras, entre elas: danificando diretamente um órgão endócrino ou alterando a função deste; interagindo com receptores hormonais ou alterando o metabolismo de um hormônio específico ⁵.

Diversas doenças renais, como a hipertensão, podem ter origem no início da vida ⁶. Durante o período crítico do desenvolvimento, o rim fetal é particularmente vulnerável aos impactos adversos dos distúrbios gestacionais, levando a modificações funcionais e estruturais, conhecidas como programação renal ⁷. Uma ampla gama de agravos a saúde materna pode induzir a programação renal, dando origem a doenças renais e hipertensão durante o envelhecimento. Estes incluem desnutrição ou doenças maternas, abuso de substâncias ou uso de medicamentos durante a gravidez, além da exposição a produtos químicos ambientais ^{3,8}.

Com base em informações disponíveis na literatura científica foram elaboradas, pela Organização Mundial de Saúde, listas de substâncias químicas suspeitas de causar desregulação do sistema endócrino ⁹. Como revisado por Maqbool *et al.* ¹⁰, cerca de 800 compostos químicos utilizados no cotidiano são capazes de desregular o ambiente hormonal, sendo que apenas uma pequena parcela foi avaliada e teve seus mecanismos de ação elucidados. Além disso, são raros os trabalhos que dão enfoque à ação combinada de vários DE, tratando em sua maioria substâncias isoladas ou em pequenos grupos. Diante da necessidade de compreender a ação dos DE em conjunto, Christiansen *et al.* ¹¹ desenvolveram uma mistura de 13 compostos químicos,

os quais foram escolhidos por representarem uma gama de outros DE e, assim, mimetizar a exposição humana.

A associação entre a exposição materna a fatores de risco ambientais e o aumento das chances de desenvolver doenças em adultos é conhecida como “programação desenvolvimentista” ou “origens desenvolvimentistas da saúde e da doença” (DOHaD). A hipótese ganhou força após surgimento de diversos estudos observacionais seguido de investigações epidemiológicas, evidenciando que insultos antes do nascimento poderiam predispor a prole a doenças não transmissíveis em momentos posteriores da vida ¹².

As doenças renais são extremamente prevalentes em todo o mundo. Cerca de 10% da população global é afetada pela doença renal crônica (DRC) ¹³. Considerando não só a doença renal, mas também a carga crescente de diversas doenças não transmissíveis globais, a OMS notificou a população sobre as políticas de prevenção e controle de doenças não transmissíveis. Tais políticas reúnem um conjunto de ações que visam conhecer a distribuição e os fatores de risco na população, identificando seus condicionantes sociais, econômicos e ambientais, com objetivo de subsidiar a prevenção e controles das mesmas ¹⁴. Tanto assim, de fato, que o conceito DOHaD torna-se uma estratégia de prevenção chave para reduzir os riscos de doenças crônicas nas próximas gerações¹⁵.

A partir dos questionamentos levantados acima, o presente estudo teve como objetivo investigar se a exposição a uma mistura de DE durante o período perinatal é capaz de provocar alterações teciduais nos diferentes compartimentos renais no envelhecimento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e Ambiente de Experimentação

24 fêmeas adultas (120 dias de idade, pesando aproximadamente 300 g) e 12 machos adultos (90 dias de idade, pesando aproximadamente 300 g) da linhagem Sprague-Dawley (SD), foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), e mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos da Unoeste. Os animais foram distribuídos na proporção de duas a três fêmeas e um macho adulto para acasalamento por gaiola de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, sendo as trocas das gaiolas e da maravalha realizadas 2 vezes por semana. Durante toda a fase de experimentação foram controladas as condições ambientais do biotério como: temperatura

(média de 23 °C a 25°C), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. Todos os animais receberam ração comercial livre de fitoestrógenos (NUVILABCR1/Nuvital-PR) e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa e bico metálicos com capacidade para 500 mL. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os procedimentos de manuseio, administração de drogas, anestesia e eutanásia dos animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Unoeste (Protocolo CEUA 6034).

2.2 Mistura de DE

Os compostos DBP (Cas nº 175606-05-0), DEHP (Cas nº 117-81-7), Vinclozin (Cas nº 50-471-44-8), Procloraz (Cas nº 67747-09-5), Procimidona (Cas nº 32809-16-8), Linuron (Cas nº 330-55-2), Epoxiconazol (Cas nº 133855-98-8), p,p'-DDE (Cas nº 72-55-9), 4-MBC (Cas nº 36861-47-9), OMC (Cas nº 5466-77-3), BPA (Cas nº 80-05-07) e Butilparabeno (Cas nº 94-26-8) foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EUA). A mistura de DE foi diluída em óleo de milho (veículo) na concentração de 32,11 mg/kg/dia e administrada por via oral (gavagem) nos animais durante o período gestacional e lactacional. A composição da mistura é descrita detalhadamente na Tabela 1, adaptada de Kristensen *et al.*¹⁶.

Tabela 1- Composição da mistura, consumo humano individual justado dos compostos químicos e misturas 100x a exposição humana.

Compostos químicos	Consumo humano ajustado e escolhido como base para estudo das misturas (mg/kg de peso corpóreo ao dia) ¹	Mistura 100x (mg/kg de peso corpóreo ao dia)
DBP	0,01	1
DEHP	0,02	2
Vinclozin	0,009	0,9
Procloraz	0,014	1,4
Procimidona	0,015	1,5
Linuron	0,0006	0,06
Epoxiconazol	0,01	1
p,p'-DDE	0,001	0,1
4-MBC	0,06	6
OMC	0,12	12
Bisfenol A	0,0015	0,15
Butilparabeno	0,06	6
Total (mg/kg)	0,32	32,11

¹Ver Kristensen *et al.* (2012) para informações detalhadas sobre as estimativas do consumo humano e para as concentrações ajustadas que serão escolhidas como base para a mistura

2.3 Delineamento Experimental

A presença de esperma no esfregaço vaginal e a citologia vaginal positiva da fase de estro foram consideradas como indicadoras do dia gestacional 0 (DG0). As fêmeas consideradas prenhes foram mantidas individualmente nas gaiolas e divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais (n = 10/grupo): Grupo Ctrl (veículo: óleo de milho, 2 mL/kg/dia por gavagem); Grupo ED Mix (32,11 mg/kg/dia da mistura de DE diluídos em óleo de milho (2 mL/kg/dia) por gavagem). Os animais do grupo ED Mix receberam uma mistura de DE desenvolvida por Kristensen *et al.* (2012) e reproduzida por Boberg *et al.*¹⁷, Isling *et al.*¹⁸, Johansson *et al.*¹⁹, Mandrup *et al.*²⁰.

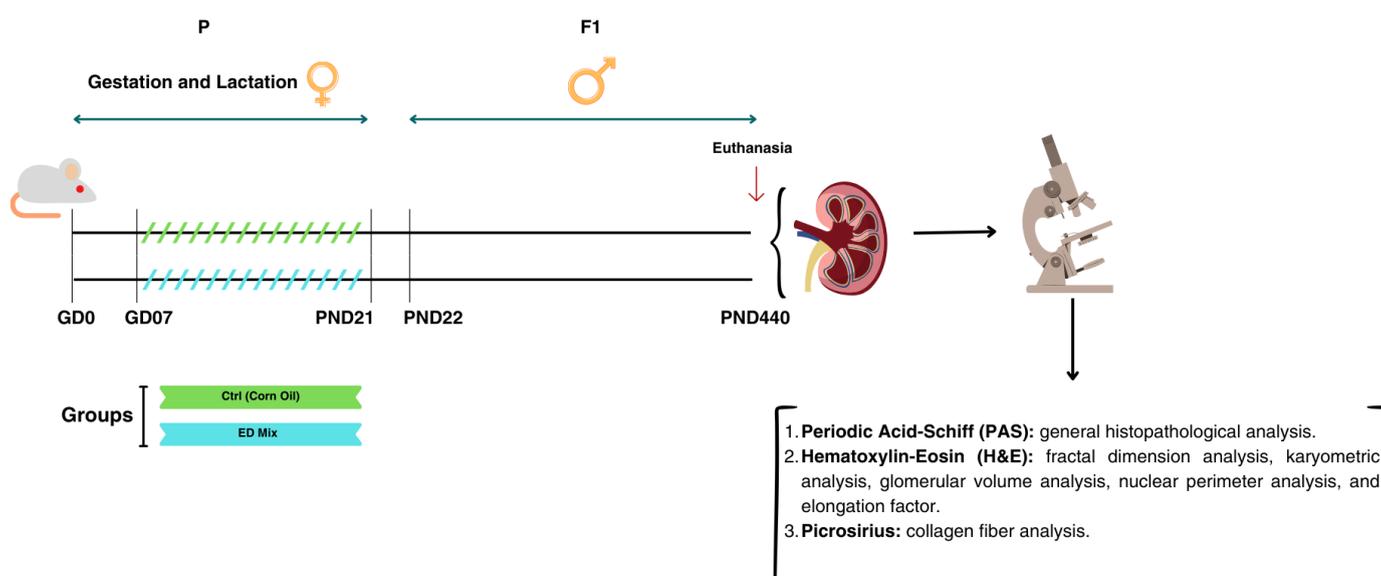
A mistura de DE sofreu adaptação em relação à original, com remoção do paracetamol da sua composição, em virtude do potencial hepatotóxico que esta droga possui.

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

Após o nascimento, o número de filhotes por ninhada foi reduzido para 8 (proporção entre machos e fêmeas de 1:1 sempre que possível), e ninhadas com número de filhotes inferior a sete não foram utilizadas no estudo.

No DPN22 foi feito o desmame dos filhotes machos, totalizando 8 animais no grupo controle (Ctrl) e 9 animais no grupo tratado (ED Mix), sendo cada animal provenientes de proles diferentes. Os animais foram mantidos até os 440 dias de idade recebendo água e ração *ad libitum*, quando foram eutanasiados por aplicação intramuscular dos anestésicos cetamina e xilazina, seguido de exsanguinação. Os rins esquerdos e direito foram removidos, pesados e utilizados para as análises histológicas.

Figura 1- Representação esquemática do delineamento experimental. As linhas referem-se ao período de exposição das ratas prenhas (GD07 a PND21) com a mistura de 12 DE. As linhas verdes representam a gavagem para o grupo exposto apenas ao óleo de milho e linhas azuis para a exposição à mistura de DE. Período da eutanásia (seta vermelha – PND440). GD (Gestational



Day); PND (Postnatal Day).

2.4 Índice Organo-Somático

O peso dos ratos foi registrado logo após a aplicação intramuscular dos anestésicos, seguido pela eutanásia. O peso de cada rim foi registrado e o coeficiente do órgão foi calculado como peso do órgão/peso corpóreo x 100%.

2.5 Análise da estrutura renal

Os fragmentos do rim foram fixados por imersão em metacarn (6 metanol: 3 clorofórmio: 1 ácido acético) e mantidos em álcool 70%. Com isso, posteriormente o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol, clarificado em xilol e incluído em paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO, USA). Os fragmentos incluídos em paraplast foram seccionados com 4µm de espessura em micrótomo rotativo e submetidos às seguintes colorações:

1. **Ácido Periódico de Schiff (PAS):** análise histopatológica de ordem geral.
2. **Hematoxilina - Eosina (HE):** análise da dimensão fractal, análise kariométrica, análise de volume glomerular, análise de perímetro nuclear e fator de alongamento.
3. **Picrossírius:** análise das fibras de colágeno.

2.5.1 Análise Histopatológica

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

2.5.2 Análise Kariométrica

A análise kariométrica foi realizada em secções histológicas coradas com H.E de 10 animais/grupo, sendo fotografado 4 campos histológicos/secção, aumento de 100x e realizada a medição de 5 regiões nucleares/fotografia aleatórias. Áreas de seção transversal nuclear (µm²) e perímetros (µm) foram determinados para núcleos de 200 células secretoras epiteliais para obter o parâmetro do fator de forma $[=4\pi \cdot \text{área nuclear}/(\text{perímetro nuclear})^2]$. O parâmetro do fator de forma mede arredondamento e valores indicam a forma do núcleo, variando de 0 a 1, onde 1 representa uma forma perfeitamente circular.

2.5.3 *Análise Fractal*

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

2.5.4 *Análise do Volume Glomerular*

Foram selecionados pelo menos cem glomérulos para cada grupo. Os diâmetros menor e maior para cada glomérulo foram medidos usando o *software Image J* (National Institute of Health, EUA). O volume glomerular foi calculado pela seguinte fórmula: $4\Pi(d(G)/23)^3/3$, onde d(G) representa a média aritmética dos diâmetros maior e menor²².

2.5.5 *Análise Perímetro Nuclear e Fator de Alongamento*

Foi realizada em secções histológicas coradas com H.E de 10 animais/grupo, sendo fotografados 4 campos histológicos/secção, aumento de 100x e realizada a medição de 5 regiões nucleares/secção histológica. Para cada núcleo foi avaliado o perímetro (μm) e o fator de alongamento (diâmetro menor/diâmetro maior). Para o fator de alongamento valores = 1 estão associados a núcleos circulares e valores menores que 1 indicam uma forma mais alongada.

2.5.6 Quantificação dos Colágenos tipo I e tipo III

Foram analisadas secções histológicas, coradas com Picrosirius, de 10 animais/grupo, sendo fotografados 10 campos histológicos/secção em aumento de 40x. As lâminas foram analisadas utilizando luz polarizada, que diferencia os tipos de colágeno através da intensidade das fibras birrefringentes. Mais especificamente, a coloração avermelhada representa o colágeno tipo I e a cor esverdeada refere-se ao colágeno tipo III ^{23,24}. Usando a ferramenta RGB *measure* do Image J, as fibras de colágeno foram diferenciadas e quantificadas (Image J, 2004).

2.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos nas análises foram testados estatisticamente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, onde constatou-se que os dados biométricos (índice organo-somático e peso absoluto do rim), análise de volume glomerular, análise de fator de alongamento (glomérulo), análise fractal por HE (córtex, medula e glomérulo), análise histopatológica e análise fractal por picrosirius (córtex) eram paramétricos. Posteriormente, foi aplicado o teste T-student para averiguação da significância entre os grupos através do *software* Prism 5.0 (GraphPad) (significância com valor de $p < 0,05$). Já a análise de perímetro nuclear, análise de fator de alongamento (córtex e medula), análise de quantificação de colágeno tipo I e III (córtex, glomérulo e medula), análise fractal por picrosirius (glomérulo e medula) não obtiveram distribuição normal, sendo aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (significância com valor de $p < 0,05$).

3. RESULTADOS

Na avaliação do índice organo-somático foi verificado que a mistura de DE não alterou o e o peso absoluto do rim quando comparado ao grupo Ctrl (Tabela 2).

Tabela 2- Dados biométricos da prole de ratos expostos durante a gestação, lactação a uma mistura de DE baseada na exposição humana.

Parameters	Ctrl	ED MIX
Organosomatic Indices	0.3646 ± 0.061	0.3518 ± 0.056
Absolute Kidney Weight (g)	1.983 ± 0.288	1.711 ± 0.429

Os resultados são expressos em média ± DP. $p < 0,05$ em relação ao grupo Ctrl.

A análise histopatológica abordou parâmetros incluindo vacuolização citoplasmática, necrose, congestão, hemorragia, vacuolização nuclear, infiltrado inflamatório e fusão tubular. Após a análise e pontuação desses parâmetros observou-se que o grupo exposto à mistura de DE apresentou uma tendência biológica ($p = 0.0687$) para um maior número de alterações histopatológicas (Tabela 3 e Figura 2). Entre as alterações mais prevalentes no grupo ED Mix destacam-se necrose (Figura 2, círculo) e fusão tubular (Figura 2, círculo tracejado) (66,6% no grupo ED Mix vs 12,5% no grupo Ctrl) (Tabela 3).

Tabela 3- Escore histopatológico de ratos expostos à mistura de DE na gestação e lactação.

MIX	Ctrl	DE
Number of Animals Examined	08	09
Parameters		
Cytoplasmic Vacuolization	7/8	9/9
Necrosis	1/8	6/9
Congestion	6/8	9/9
Hemorrhage	0/8	0/9
Nuclear Vacuolization	4/8	7/9
Inflammatory Infiltrates	8/8	9/9
Tubular Fusion	1/8	6/9

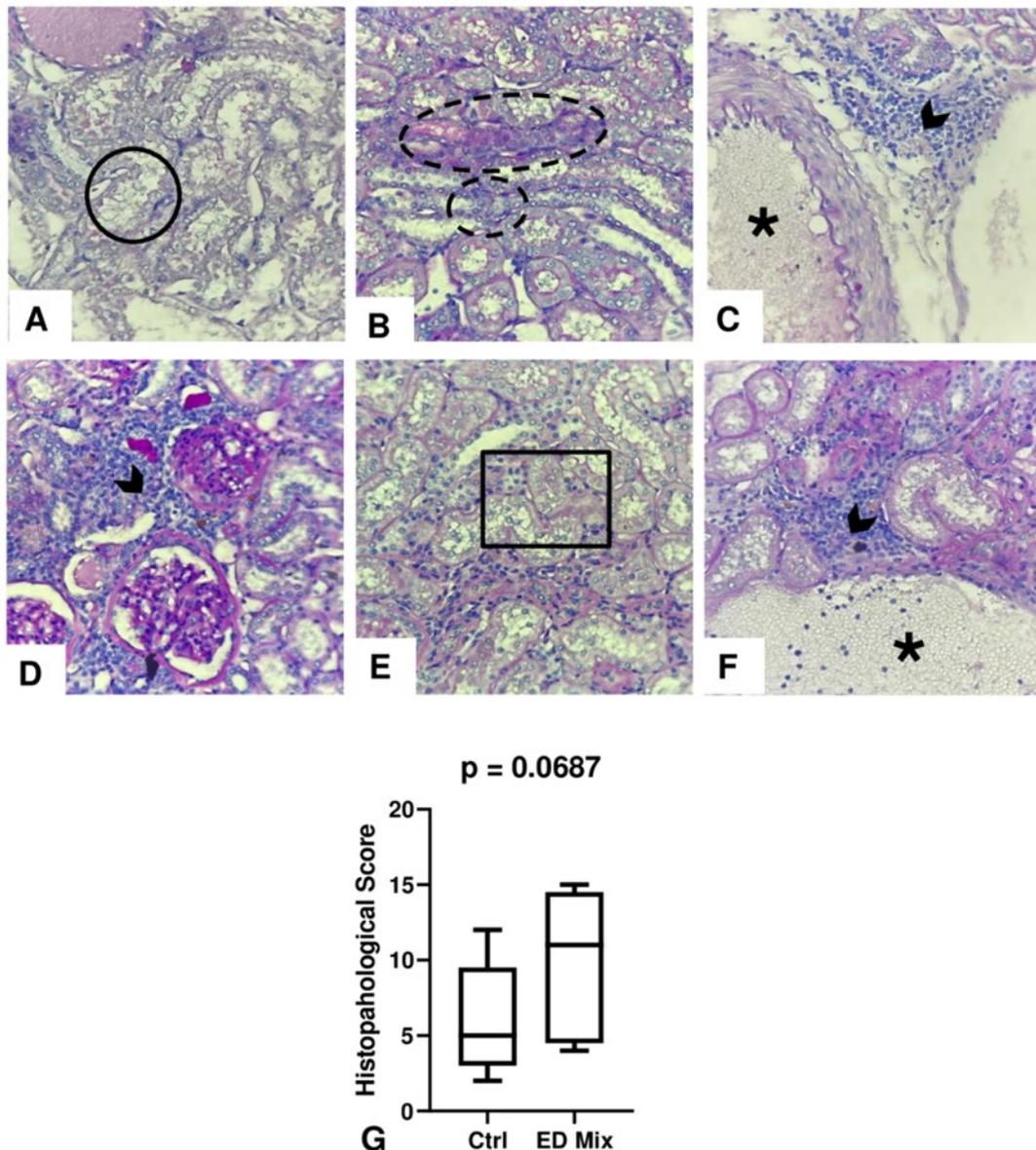


Figura 2- Cortes histológicas e escore histopatológico no rim de ratos expostos a uma mistura de DE durante a gestação e lactação. Detalhes das lesões renais identificadas nos grupos experimentais: (A) necrose (círculo), (B) fusão tubular (círculo tracejado), (C) congestão venosa (asterisco) e infiltrado inflamatório (ponta de seta), (D) infiltrado inflamatório (ponta de seta), (E) vacuolização citoplasmática (quadrado), (F) congestão venosa (asterisco) e infiltrado inflamatório (ponta de seta). (n = 10/grupo). Aumento de 40X. Coloração: PAS. (G) Representação gráfica das médias dos escores histopatológicos. Os resultados foram expressos como mediana [intervalo interquartil], Teste de Mann-Whitney.

A figura 3 evidencia que a exposição à mistura de DE modificou o fenótipo nuclear das células renais e estas alterações foram dependentes do compartimento analisado.

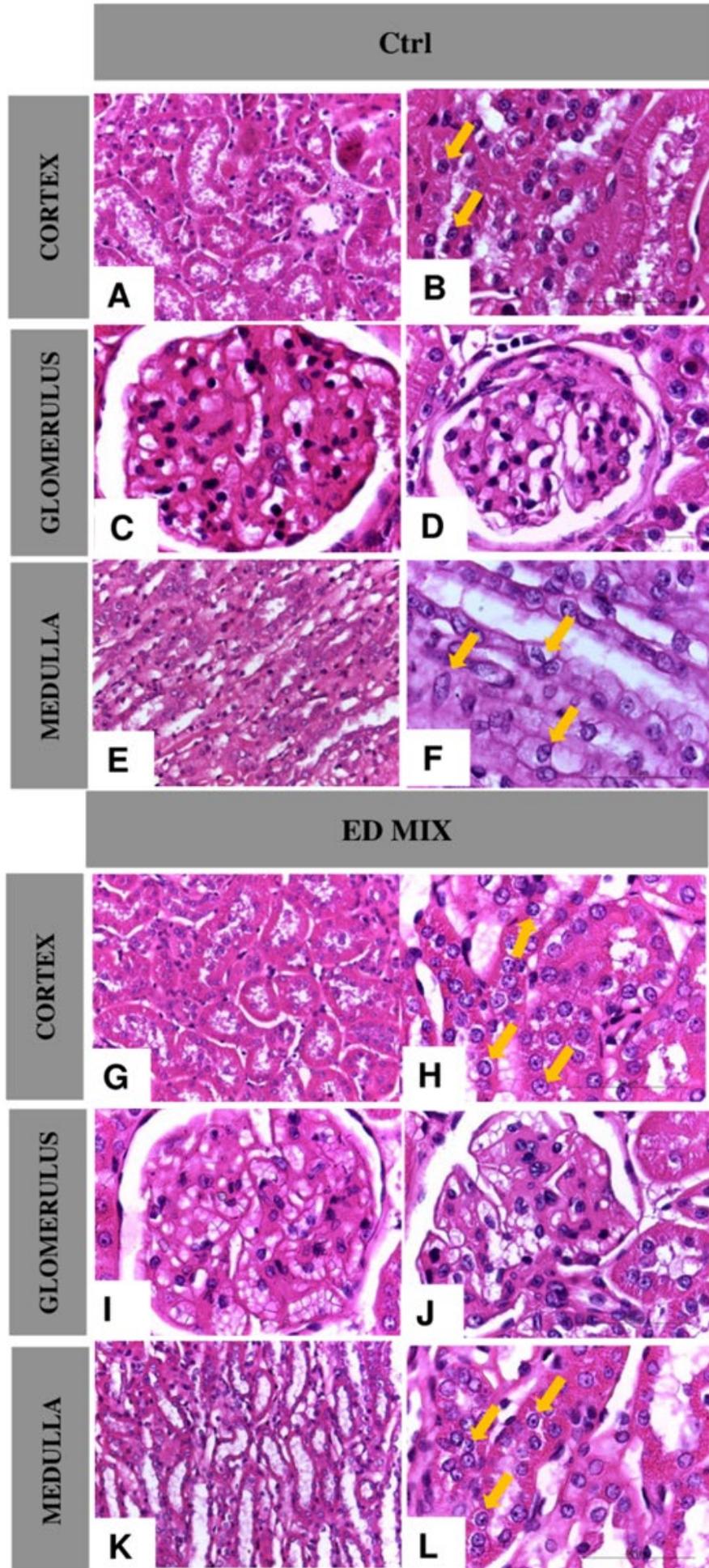


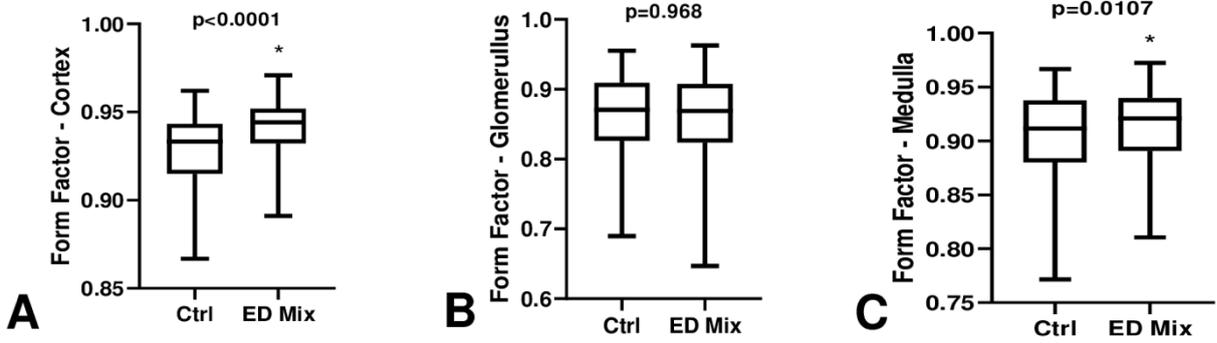
Figura 3- Cortes histológicos de diferentes compartimentos renais (córtex, glomérulo e medula). As regiões corticais e medulares no grupo ED Mix apresentaram núcleos mais arredondados (H, L, setas) enquanto no grupo Ctrl eram mais elípticos (B, F, setas). Ampliação de 40X (A, E, G, K). Ampliação de 100X (B, C, D, F, H, I, J, L) (10 animais/grupo). Coloração: HE.

A análise kariométrica indicou que a mistura de DE foi responsável por aumentar o fator forma do núcleo das células córtex ($p < 0,0001$) e medula ($p = 0,0107$), indicando núcleos mais arredondados (Figura 3, setas; Figura 4A e C). A análise do perímetro nuclear corrobora com estes resultados, indicando a presença de núcleos maiores nas células corticais ($p < 0,0001$) e medulares ($p = 0,0032$) dos animais expostos à mistura de DE (Figura 4D e F). Em contrapartida, o fator de alongamento não mostrou diferença entre os grupos em nenhuma das análises (figura 4J, K e L).

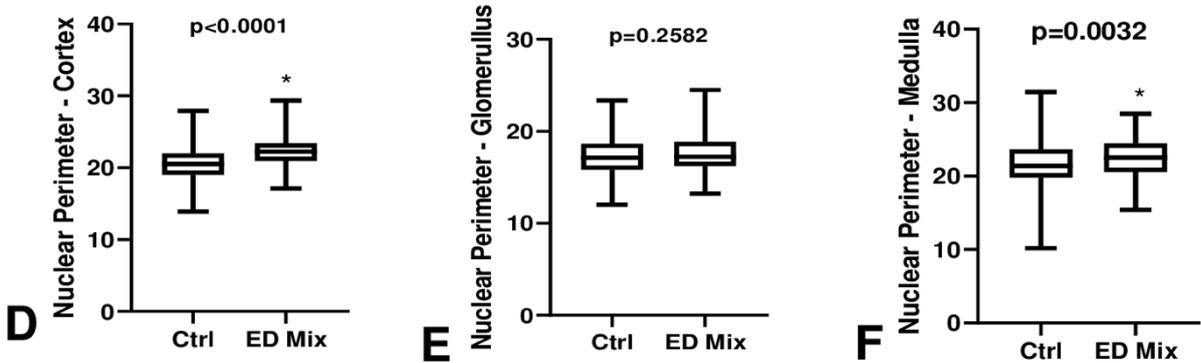
Além das alterações no formato nuclear, o padrão de distribuição celular também foi alterado. A análise fractal apontou diferença entre os grupos experimentais, mostrando no grupo ED Mix redução da dimensão fractal nas células glomerulares ($p < 0,0001$) e aumento nas células medulares ($p = 0,0018$) (Figura 4H e I).

Os glomérulos também apresentaram alteração em seu volume, como indicado na figura 5, onde pode ser observado redução nos animais exposto à mistura de DE ($p = 0,0256$).

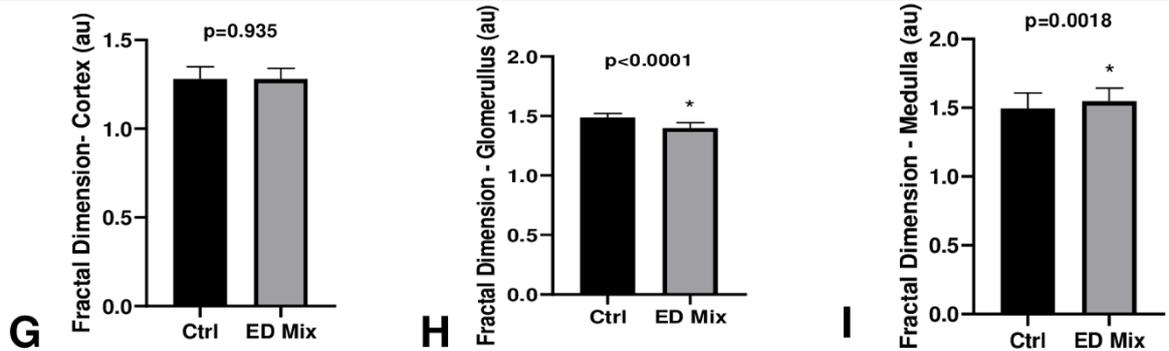
Karyometric Analysis



Nuclear Perimeter Analysis



Fractal Analysis



Elongation Factor Analysis

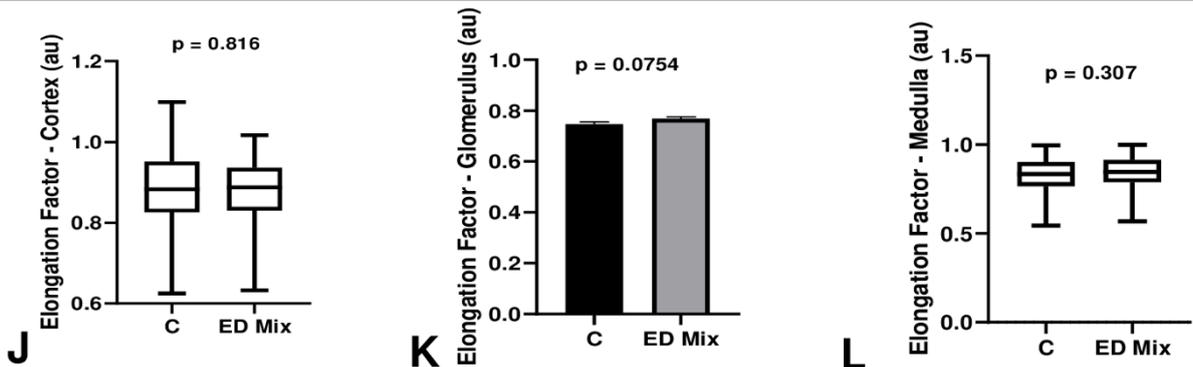


Figura 4- Representação gráfica da análise kariométrica (A, B, C), perímetro nuclear (D, E, F), análise fractal (G, H, I), fator de alongamento (J, K, L). Resultados expressos como média \pm DP (G, H, I, K, teste t-student) ou mediana [intervalo interquartil] (A, B, C, D, E, F, J, L, teste de Mann-Whitney).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

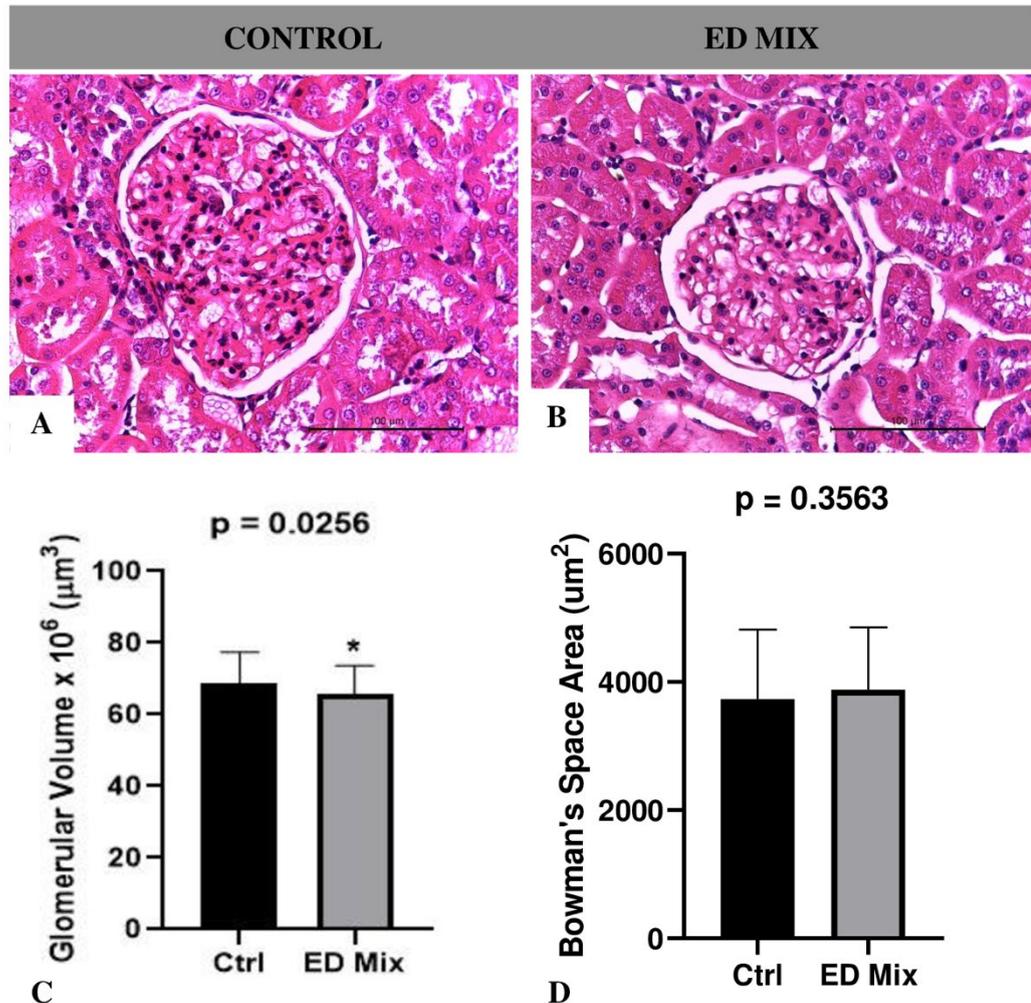


Figura 5- Cortes histológicas de glomérulos de ratos expostos durante a gestação e lactação, a uma mistura de doze DEs. Características morfológicas do glomérulo nos grupos Ctrl (A) e ED Mix (B). Os gráficos representam a quantificação do volume glomerular (C) e da área do espaço da capsula de Bowman (D). Resultados expressos em média \pm DP (10 animais/grupo). Ampliação 100x. Coloração: HE. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Ctrl.

Com relação ao estroma renal, a exposição à mistura de DE foi capaz de alterar a quantidade e a distribuição das fibras de colágeno (Figura 6, setas brancas) de maneira compartimento-dependente. Verificou-se aumento na proporção de fibras de colágeno tipo I e

tipo III no córtex e na medula ($p < 0,0001$) (Figura 6M, O, P e R) e redução no glomérulo ($p < 0,0001$) (Figura 6N e Q), o que corrobora com a diminuição do volume glomerular verificado nos animais expostos à mistura de DE. Além disso, o padrão de distribuição das fibras de colágeno também foi alterado ($p < 0,0001$) (Figura 6S, T e U), mostrando que a mistura de DE impacta também na remodelação do estroma renal.

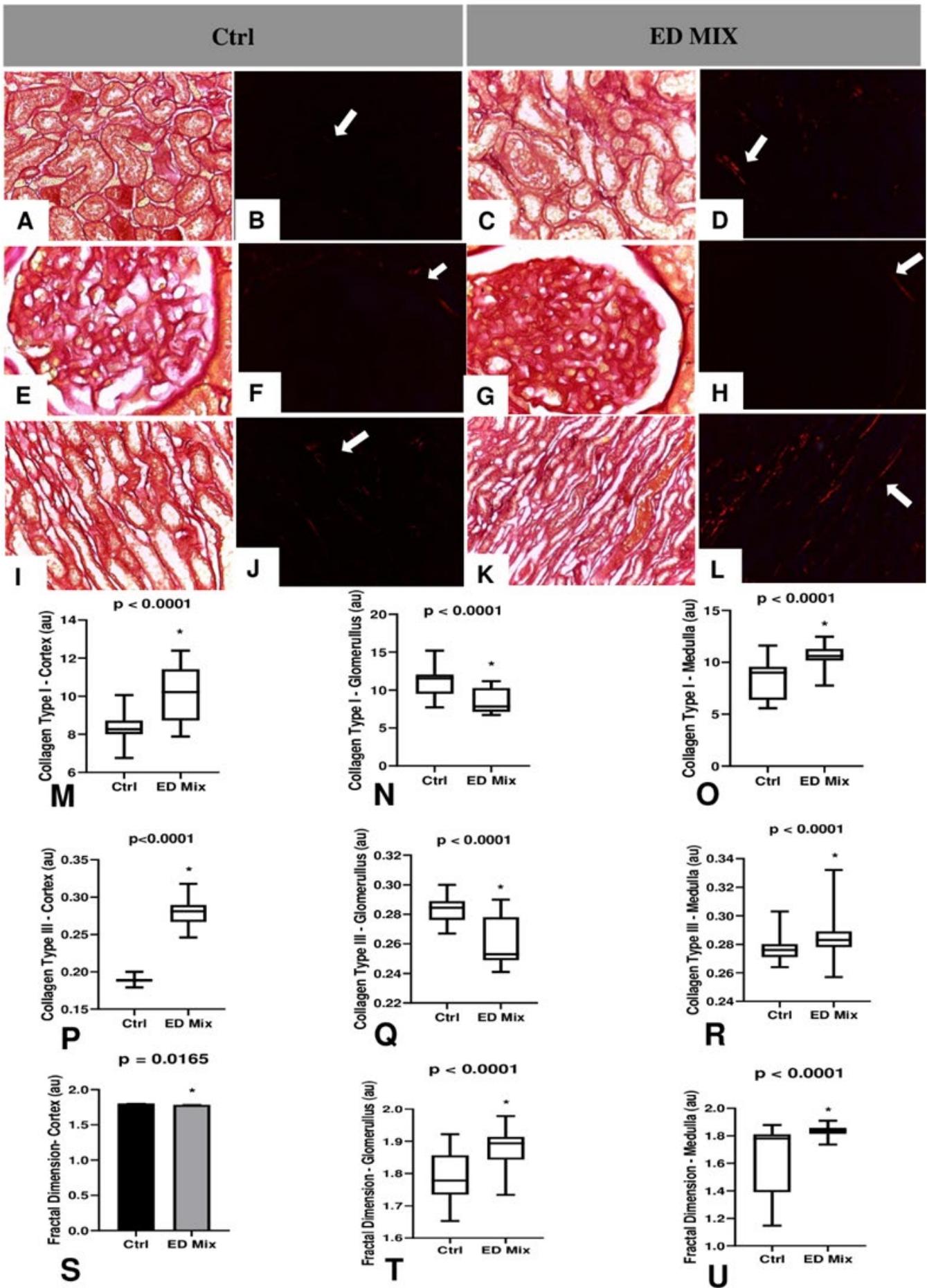


Figura 6- Cortes histológicos de rim de rato expostos durante a gestação e lactação a uma mistura de doze DEs. Características morfológicas do estroma renal em Ctrl (A e B - Córtex, E e F - Glomérulo, I e J - Medula) e ED Mix (C e D - Córtex, G e H - Glomérulo, K e L - Medula). Os gráficos representam a quantificação de colágeno tipo I (M, N, O), colágeno tipo III (P, Q, R) e dimensão fractal (S, T, U). Em M, N, O, P, Q, R, T, U, os resultados são expressos como mediana [intervalo interquartil], Teste de Mann-Whitney. Em S os resultados são expressos como média \pm DP, Teste T-Student. (10 animais/grupo). Ampliação 100x. Coloração: Picrosirius. *p <0,05 comparado ao grupo Ctrl.

4. DISCUSSÃO

Nas últimas três décadas assistiu-se ao surgimento de evidências que demonstram a importância do meio ambiente durante o início da vida para o surgimento de doenças crônicas durante o envelhecimento e nas gerações futuras¹⁵. O modelo das origens do desenvolvimento da patogênese da doença é apoiado por evidências biológicas de experimentos com animais. Estes demonstraram que a alteração da dieta materna durante a gravidez pode modificar os processos fisiológicos da prole e que essas modificações são duradouras²⁵.

Estudos em animais experimentais deixaram claro que os efeitos da nutrição no início da vida a longo prazo atuam através de alterações no desenvolvimento de órgãos e tecidos como pâncreas, fígado, rins, músculo esquelético e tecido adiposo. Assim como estudos pioneiros do tema realizado em Hertfordshire no Reino Unido para explorar a associação do início da vida com doenças crônicas na idade adulta²⁶ e os estudos com modelos animais revisados por Bertram & Hanson²⁵, o presente estudo mostrou significativas alterações na estrutura renal de ratos idosos apenas com a exposição materna durante o período de gestação e lactação.

O impacto dos produtos químicos ambientais na saúde pública e no bem-estar clínico é reconhecido há muito tempo. O fígado é considerado o principal órgão alvo para a maioria dos produtos químicos implicados na indução de efeitos tóxicos após a exposição ambiental. No entanto, dados emergentes e também o presente estudo sugerem que o rim é também um local importante de lesão após exposição a produtos químicos, embora permaneçam lacunas substanciais relativas aos efeitos específicos sobre a função renal².

O desenvolvimento renal em humanos ocorre no útero entre o 5º e 36ª semana. Assim, no final da gestação, a nefrogênese é completa, e a arquitetura renal básica, incluindo vascular, redes neurais e hormonais são estabelecidas. Tal como acontece com os humanos, no entanto, a maturação do rim em animais continua durante o desmame e início do pós-desmame períodos⁷. Visto o longo período de desenvolvimento renal, é factível que o rim seja sensível à efeitos adversos intrauterinos e neonatais, como demonstrado no estudo.

Kett e Denton⁷ usa o termo programação renal para descrever as uma série de agravos que o rim pode sofrer durante seu desenvolvimento. As consequências dessa programação podem se manifestar grosseiramente como redução do tamanho do rim ou mais sutilmente, como alterações atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona renal. O presente estudo não mostrou alteração no peso renal entre os grupos; apesar deste resultado discrepante, outros autores demonstraram que a programação do rim pode ocorrer na ausência quaisquer efeitos sobre o peso ao nascer^{27,28}.

O estudo de Sangai *et al.*²⁹, ao avaliar o rim de ratos expostos ao BPA por 30 dias, identificaram alterações degenerativas, aumento da vacuolização, desorganização do glomérulo e aumento do espaço entre o glomérulo e a parede da cápsula. Nosso estudo usou um score para avaliar em conjunto as alterações histológicas, e foi verificado uma tendência biológica, com maior predisposição a lesões, como necrose e fusão tubular, no grupo exposto à mistura de DE.

A vacuolização citoplasmática, apesar de um processo na maior parte das vezes reversível, pode ser causada por exposição a uma série de produtos químicos e precede a elevação da creatinina³⁰, um importante marcador de função renal. Outro achados importantes no grupo ED Mix é a presença de congestão venosa, necrose e fusão tubular, alterações que denotam possível dano tubular e tentativa de regeneração no grupo exposto aos DE. Kata *et al.*³¹ avaliaram a histologia renal em ratos expostos ao pesticida Malation por seis dias e observaram inflamação de diversos tecidos, incluindo o rim, no qual foi observado, assim como em nosso estudo, congestão de vasos sanguíneos, gerando falta de fornecimento normal de oxigênio e necrose nas regiões adjacentes.

A análise kariométrica, ou seja, a quantificação de características nucleares das células em microscopia óptica, tem sido aplicada com sucesso na classificação de vários tipos de câncer³². Tosi *et al.*³³ encontraram uma correlação positiva entre o resultado morfométrico e a sobrevida em pacientes com neoplasia renal em estágio inicial. Tal estudo demonstrou que pacientes com núcleos das células tumorais renais mais circulares apresentaram maior taxa de sobrevida em cinco anos. Nosso estudo evidenciou um aumento no fator forma nuclear do córtex e da medula, indicando que os núcleos das células epiteliais dessas regiões estavam mais arredondados nos ratos expostos à mistura de DE. Em contrapartida, o perímetro nuclear estava maior no córtex e na medula, sendo este um fator prognóstico negativo em células tumorais renais. Este preditor é baseado na suposição que um grande núcleo é uma manifestação morfológica de conteúdo anômalo de DNA^{34,35}. Esses resultados discordantes talvez possa ser explicado pela ausência de processo tumorais estabelecidos na células de nosso estudo. Além

disso, o valor desta análise em células benignas e suas correlações clínicas ainda carecem de estudos na literatura.

A análise fractal é uma ferramenta poderosa na compreensão de estruturas complexas, como as encontradas em sistemas biológicos, incluindo células. Pode ser usada para quantificar a organização espacial e a complexidade das estruturas teciduais³⁶. Nas células renais esta análise pode ser aplicado de várias maneiras, como na morfologia celular, estrutura tubular e microcirculação renal. Li et al.³⁷ avaliaram a análise fractal em pacientes com hipertensão arterial e sugerem que a diminuição na complexidade fractal está associado a progressão da doença renal crônica. Na mesma linha de raciocínio Wang et al.³⁸ utilizaram a aplicação da geometria fractal como forma de avaliação precoce a danos renais relacionados com diabetes. Em nosso estudo a análise fractal apresentou-se alterada no glomérulo e medula do grupo ED Mix, mostrando que a exposição perinatal aos desreguladores endócrinos pode alterar a estrutura renal e homogeneidade celular.

O grupo exposto durante a gestação e lactação aos desreguladores endócrinos apresentou significativa redução de volume glomerular. Corroborando com este resultado, Moraes *et al.*³⁹, ao exporem ratos a fumaça de cerca de 40 cigarros/dia por 28 dias, observaram que o grupo exposto apresentou menor volume glomerular, o que clinicamente refletiu em menor volume urinário e aumento de níveis de glicemia e creatinina sérica, impactando na homeostasia renal

A fibrose renal é caracterizada pela deposição patológica de colágeno, sendo que os tipos de colágeno I e III são os principais componentes deste acúmulo. Baues et al.⁴⁰ e Stanchev et al.⁴¹ evidenciaram que o colágeno tipo I é uma proteína intersticial típica, sendo assim, a fibrose renal é caracterizada pelo aumento expressivo deste tipo de proteína. Nosso estudo constatou alteração na distribuição de fibras colágenos nos três compartimentos renais avaliados, além de aumento de depósito de colágeno tipo I e III no cortex e medula e redução no glomérulo no grupo exposto aos desreguladores endócrinos. Tais dados possuem uma relevância clínica significativa, pois a fibrose é um achado comum nas doenças renais crônicas, independente da etiologia^{40,42}.

Os resultados das análises do colágeno vem em concordância com outros estudos como de Zhu et al.⁴³, que expos ratas prenhas ao DBP durante a gestação e observou na prole adulta aumento da displasia e fibrose renal e também com o estudo de Priego et al.⁴⁴ que analisou os efeitos da exposição por 5 semanas de BPA em ratos nefrectomizados, levando a infiltração inflamatória, lesão tubular e fibrose renal. Ambos os estudos podem explicar os efeitos devido

aumento de genes pró-inflamatórios e aumento significativo do estresse oxidativo, reforçando os efeitos deletérios dos tóxicos ambientais e seus efeitos profibróticos.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a mistura de DE foi capaz de alterar o fenótipo nuclear nos diferentes compartimentos renais, além de promover aumento das fibras de colágeno, estimulando a fibrose renal. Tais alterações foram verificadas em animais idosos, mostrando o potencial da exposição perinatal a DE em alterar o microambiente tecidual renal no envelhecimento. Esses resultados destacam a necessidade contínua de pesquisas para elucidar os mecanismos subjacentes e as consequências a longo prazo dessa exposição, bem como a importância de medidas preventivas para proteger a saúde renal e geral durante os estágios críticos do desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

1. Murray IV, Paolini MA. Histology, Kidney and Glomerulus. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2024. Accessed December 9, 2024. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554544/>
2. Kataria A, Trasande L, Trachtman H. The effects of environmental chemicals on renal function. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(10):610-625. doi:10.1038/nrneph.2015.94
3. Xu X, Nie S, Ding H, Hou FF. Environmental pollution and kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(5):313-324. doi:10.1038/nrneph.2018.11
4. Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(3-5):204-215. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.08.007
5. EUROPEAN. *European Workshop on Endocrine Disrupters*. European ED workshop; 2001.
6. Luyckx VA, Bertram JF, Brenner BM, et al. Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. *The Lancet*. 2013;382(9888):273-283. doi:10.1016/S0140-6736(13)60311-6
7. Kett MM, Denton KM. Renal programming: cause for concern? *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(4):R791-R803. doi:10.1152/ajpregu.00791.2010
8. Nüsken E, Dötsch J, Weber LT, Nüsken KD. Developmental Programming of Renal Function and Re-Programming Approaches. *Front Pediatr*. 2018;6:36. doi:10.3389/fped.2018.00036

9. Petrović M, Eljarrat E, López De Alda MJ, Barceló D. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *TrAC Trends Anal Chem.* 2001;20(11):637-648. doi:10.1016/S0165-9936(01)00118-2
10. Maqbool F, Mostafalou S, Bahadar H, Abdollahi M. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life Sci.* 2016;145:265-273. doi:10.1016/j.lfs.2015.10.022
11. Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, et al. Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J Androl.* 2012;35(3):303-316. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01242.x
12. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med.* 2007;261(5):412-417. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01809.x
13. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet.* 2012;380(9859):2095-2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0
14. World Health Organization. Tackling Ncds: 'Best Buys' and Other Recommended Interventions for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. Published online 2017. Accessed September 2, 2023. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091078>
15. Baird J, Jacob C, Barker M, et al. Developmental Origins of Health and Disease: A Lifecourse Approach to the Prevention of Non-Communicable Diseases. *Healthcare.* 2017;5(1):14. doi:10.3390/healthcare5010014
16. Kristensen DM, Lesné L, Le Fol V, et al. Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *Int J Androl.* 2012;35(3):377-384. doi:10.1111/j.1365-2605.2012.01282.x
17. Boberg J, Johansson HKL, Hadrup N, et al. Perinatal exposure to mixtures of anti-androgenic chemicals causes proliferative lesions in rat prostate: Late Effects of Early Anti-Androgen Exposure. *The Prostate.* 2015;75(2):126-140. doi:10.1002/pros.22897
18. Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, et al. Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters. *Reproduction.* 2014;147(4):465-476. doi:10.1530/REP-13-0448
19. Johansson HKL, Jacobsen PR, Hass U, et al. Perinatal exposure to mixtures of endocrine disrupting chemicals reduces female rat follicle reserves and accelerates reproductive aging. *Reprod Toxicol.* 2016;61:186-194. doi:10.1016/j.reprotox.2016.03.045
20. Mandrup KR, Johansson HKL, Boberg J, et al. Mixtures of environmentally relevant endocrine disrupting chemicals affect mammary gland development in female and male rats. *Reprod Toxicol.* 2015;54:47-57. doi:10.1016/j.reprotox.2014.09.016
21. Sümer E, Senturk GE, Demirel ÖU, Yesilada E. Comparative biochemical and histopathological evaluations proved that receptacle is the most effective part of Cynara

- scolymus against liver and kidney damages. *J Ethnopharmacol.* 2020;249:112458. doi:10.1016/j.jep.2019.112458
22. Yildiz G, Mağden K, Abdulkerim Y, Ozcicek F, Hür E, Candan F. Glomerular filtration rate: which method should we measure in daily clinical practice? *Minerva Med.* 2013;104(6):613-623.
 23. Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani R. Differential Staining of Collagens Type I, II and III by Sirius Red and Polarization Microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1978;41(3):267-274. doi:10.1679/aohc1950.41.267
 24. Montes GS, Krisztán RM, Shigihara KM, Tokoro R, Mourão PAS, Junqueira LCU. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. *Histochemistry.* 1980;65(2):131-141. doi:10.1007/BF00493161
 25. Bertram CE, Hanson MA. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br Med Bull.* 2001;60(1):103-121. doi:10.1093/bmb/60.1.103
 26. Barker DJP. *Mothers, Babies and Health in Later Life.* 2nd ed. Churchill Livingstone; 1994.
 27. Denton KM, Kett MM, Dodic M. Programming Hypertension—Animal Models. In: Wintour EM, Owens JA, eds. *Early Life Origins of Health and Disease.* Vol 573. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US; 2006:103-120. doi:10.1007/0-387-32632-4_9
 28. Moritz KM, Singh RR, Probyn ME, Denton KM. Developmental programming of a reduced nephron endowment: more than just a baby's birth weight. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 2009;296(1):F1-F9. doi:10.1152/ajprenal.00049.2008
 29. Sangai NP, Verma RJ. Quercetin ameliorates bisphenol A-induced toxicity in mice. *Acta Pol Pharm.* 2012;69(3):557-563.
 30. Carraro-Eduardo JC, Santino MFF, Macedo HWD, Silva LED. Impact of gender in early structural changes of contrast induced nephropathy in rats. *J Bras Nefrol.* 2016;38(4). doi:10.5935/0101-2800.20160063
 31. S. Kata F. Short-time Effects of Malathion Pesticide on Functional and Histological Changes of Liver and Kidney in Female Mice. *Pak J Biol Sci.* 2020;23(9):1103-1112. doi:10.3923/pjbs.2020.1103.1112
 32. van der Poel HG, Mulders PF, Oosterhof GO, et al. Prognostic value of karyometric and clinical characteristics in renal cell carcinoma. Quantitative assessment of tumor heterogeneity. *Cancer.* 1993;72(9):2667-2674. doi:10.1002/1097-0142(19931101)72:9<2667::aid-cncr2820720924>3.0.co;2-0
 33. Tosi P, Luzi P, Baak JP, et al. Nuclear morphometry as an important prognostic factor in stage I renal cell carcinoma. *Cancer.* 1986;58(11):2512-2518. doi:10.1002/1097-0142(19861201)58:11<2512::aid-cncr2820581126>3.0.co;2-o
 34. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, et al. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res.* 1983;43(9):3982-3997.

35. Ruiz JL, Hernández M, Martínez J, Vera C, Jimenez-Cruz JF. Value of Morphometry as an Independent Prognostic Factor in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 1995;27(1):54-57. doi:10.1159/000475124
36. Barnsley MF, Demko SG. Iterated function systems and the global construction of fractals. *Proc R Soc Lond Math Phys Sci*. 1985;399(1817):243-275. doi:10.1098/rspa.1985.0057
37. Li X, Ma J, Zhang X, Wu X. Fractal analysis of kidney glomerular morphology in essential hypertension. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(16):2445-2449.
38. Wang D, Liu J, He S, et al. Assessment of early renal damage in diabetic rhesus monkeys. *Endocrine*. 2014;47(3):783-792. doi:10.1007/s12020-014-0211-4
39. Moraes LAC, Breda-Stella M, Carvalho CA. Estudo morfofuncional sobre os efeitos do tabagismo passivo em rins de ratos. *Einstein*. 2021;19:eAO6000.
40. Baues M, Klinkhammer BM, Ehling J, et al. A collagen-binding protein enables molecular imaging of kidney fibrosis in vivo. *Kidney Int*. 2020;97(3):609-614. doi:10.1016/j.kint.2019.08.029
41. Stanchev S, Stamenov N, Kirkov V, Dzhambazova E, Nikolov D, Paloff A. Differential collagen expression in kidney and heart during hypertension. *Bratisl Med J*. 2020;121(01):73-78. doi:10.4149/BLL_2020_011
42. Panizo S, Martínez-Arias L, Alonso-Montes C, et al. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):408. doi:10.3390/ijms22010408
43. Zhu YP, Chen L, Wang Xjie, et al. Maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) induces renal fibrosis in adult rat offspring. *Oncotarget*. 2017;8(19):31101-31111. doi:10.18632/oncotarget.16088
44. Priego AR, Parra EG, Mas S, Morgado-Pascual JL, Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S. Bisphenol A Modulates Autophagy and Exacerbates Chronic Kidney Damage in Mice. *Int J Mol Sci*. 2022;22(13):7189. doi:10.3390/ijms22137189

ANEXO

Author instructions

You can find the **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** instructions for authors [here](#).

To view the PDF file linked above, you will need Adobe Acrobat Reader.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Mission Statement

Journal of Developmental Origins of Health and Disease (J DOHaD) is the official scientific journal of the International Society for Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD).

Aims and Scope

JDOHaD publishes leading research in the field of Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). The Journal focuses on the environment during early pre-natal and post-natal animal and human development, interactions between environmental and genetic factors, including environmental toxicants, and their influence on health and disease risk throughout the lifespan. *JDOHaD* publishes work on developmental programming, fetal and neonatal biology and physiology, early life nutrition, especially during the first 1,000 days of life, human ecology and evolution and Gene-Environment Interactions.

JDOHaD also accepts manuscripts that address the social determinants or education of health and disease risk as they relate to the early life period, as well as the economic and health care costs of a poor start to life. Accordingly, *JDOHaD* is multi-disciplinary, with contributions from basic scientists working in the fields of physiology, biochemistry and nutrition, endocrinology and metabolism, developmental biology, molecular biology/ epigenetics, human biology/ anthropology, and evolutionary developmental biology. Moreover clinicians, nutritionists, epidemiologists, social scientists, economists, public health specialists and policy makers are very welcome to submit manuscripts.

The journal includes original research articles, short communications and reviews, and has regular themed issues, with guest editors; it is also a platform for conference/workshop reports, and for opinion, comment and interaction.

Categories of papers

*Original research articles** - This category is intended for full-scale basic, clinical or epidemiological studies including large controlled trials. Articles may contain up to 5,000 words (not including references, figures and tables) and should include an abstract of up to 250 words and 3–5 key words. (Exceptions to the length limitation will be considered for unusually large or complex studies.)

*Brief reports** - This category is for smaller, self-contained laboratory or clinical studies or analyses. Papers in this category may contain up to 2,500 words (not including references,

figures and tables) and should include a maximum of 25 references, up to 2 illustrations (figures or tables), an abstract of up to 150 words and 3–5 key words.

*Rapid communications** - This category is for 'fast-breaking' new work, which is of great potential interest and can be succinctly presented.

Authors who wish to submit a rapid communication must first send an abstract to the Editor-in-Chief, Michael Ross (DOHaDeditor@cambridge.org) for approval of submission in this category. Submissions that do not have prior approval will be reviewed on the regular track.

Papers in this category may contain up to 2,500 words (not including references, figures and tables) and should include a maximum of 25 references, up to 2 illustrations (figures or tables), an abstract of up to 150 words and 3–5 key words. Rapid communications will be reviewed and published on a "fast track" basis.

*Reviews** – *J DOHaD* will publish scholarly, comprehensive reviews that summarize and critically evaluate research in the field addressed and identify future implications. Reviews will be invited by the Editors but may also be submitted. Authors wishing to submit papers in this category are advised to contact either the Editor-in-Chief or appropriate Associate Editor before doing so. Reviews may contain up to 5,000 words (not including references, figures and tables) and should include an abstract of up to 250 words and 3–5 key words. (Exceptions to the length limitation will be considered if justified by the scope of the Review).

Focus Papers – These papers focus attention on a research paper published in the same issue in the journal. Focus Papers should highlight, discuss and amplify the issues addressed in the research paper adding perspectives derived the author's own work and the literature and should consider the implications of the findings. Focus papers need not necessarily agree with the paper they address. Focus Papers may contain up to 1500 words (not including references, figures and tables) and 3–5 key words. No abstract is needed. Focus Papers are invited by the Editor-in-Chief.

Letters to the Editor - Letters are invited that discuss or comment on papers published in *J DOHaD*. They should not, however, be used as a means of publishing new work. Letters should have no more than 10 references and should not contain figures or tables. Acceptance will be at the discretion of the Editorial Board, and editorial changes may be required. Wherever possible, letters from responding authors will be included in the same issue.

Editorials shall have a maximum length of **2,000 words** (the word count limit includes title, abstract, tables, figures, and references list)."

Papers in all categories, whether invited or submitted, will be peer reviewed.

Clinical Trials

As a condition of consideration for publication, registration of clinical trials in a public trials registry is required. A clinical trial is defined by the International Committee of Medical Journal Editors (in accordance with the definition of the World Health Organisation) as any research project that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Trials must be registered before the start of patient enrolment. The registry must be accessible to the public at no charge.

It must be open to all prospective registrants and managed by a not-for-profit organization. There must be a mechanism to ensure the validity of the registration data, and the registry should be electronically searchable. An acceptable registry must include at minimum a unique trial number, trial registration date, secondary identification information if assigned by sponsors or others, funding source(s), primary and secondary sponsor(s), responsible contact person, research contact person, official scientific title of the study, research ethics review, the medical condition being studied, intervention(s), key inclusion and exclusion criteria, study type, anticipated trial start date, target sample size, recruitment status, primary outcome, and key secondary outcomes. Registration information must be provided at the time of submission. Trial registry name, registration identification number, and the URL for the registry should be included at the end of the abstract.

* If publishing Gold Open Access, all or part of the publication costs for these article types may be covered by one of the agreements Cambridge University Press has made to support open access.