



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

ANA BEATRIZ RATTO GORZONI

**CARACTERIZAÇÃO DA TRÍADE EXPOSIÇÃO-GENE-DOENÇA: IMPACTO DOS
DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MICROAMBIENTE PROSTÁTICO**

Presidente Prudente - SP
2024



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

ANA BEATRIZ RATTO GORZONI

**CARACTERIZAÇÃO DA TRÍADE EXPOSIÇÃO-GENE-DOENÇA: IMPACTO DOS
DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MICROAMBIENTE PROSTÁTICO**

Tese apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

636.089
G675c

Gorzoni, Ana Beatriz Ratto.

Caracterização da tríade exposição-gene-doença:
impacto dos desreguladores endócrinos no
microambiente prostático / Ana Beatriz Ratto Gorzoni. -
Presidente Prudente, 2025.
104f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2025.

Bibliografia.

Orientador: Leonardo de Oliveira Mendes.

1. Desreguladores endócrinos. 2. Carcinogênese. 3.
Próstata. I. Título.

ANA BEATRIZ RATTO GORZONI

**CARACTERIZAÇÃO DA TRIÁDE EXPOSIÇÃO-GENE-DOENÇA: IMPACTO DOS
DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MICROAMBIENTE PROSTÁTICO**

Defesa apresentada Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do
Oeste Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor – Área de
concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal

Presidente Prudente, 13 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Edson Assunção Mareco
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Botucatu-SP

Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Botucatu-SP

DEDICATÓRIA

A Deus, meu Senhor e Salvador, dedico este trabalho. Foi pela Tua graça, misericórdia e direção que consegui alcançar esta conquista. Cada passo desta jornada, cada desafio superado, foi para a Tua glória e honra. Que este doutorado seja reflexo do Teu propósito em minha vida e que eu possa sempre ser instrumento do Teu amor e sabedoria.

Dedico também à Virgem Maria, Mãe de Deus, cujo amor me acompanhou em cada momento. Como escrava de amor de Maria, sei que sua intercessão e cuidado estiveram presentes em cada vitória e superação. Que eu possa sempre seguir com fé, vivendo e trabalhando para a maior glória de Deus, sob sua proteção maternal.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, minha gratidão infinita a Deus, cuja presença constante guiou meus passos e iluminou meu caminho, tornando possível a realização deste sonho. Cada vitória, cada superação, foram fruto de Sua graça e misericórdia.

Aos meus pais, Vânia e Luis, e ao meu irmão e cunhada, Rafael e Gabriela, que sempre me mostraram o valor do esforço, da resiliência e do amor incondicional. Obrigada por serem minha base, por acreditarem em mim quando, muitas vezes, eu mesma duvidei. Vocês são o meu porto seguro, e esse trabalho é, também, uma homenagem ao que sou graças a vocês.

Ao meu amado esposo, Renan, que esteve ao meu lado em cada etapa, oferecendo amor, paciência e uma força que parecia inesgotável. Sem sua compreensão e apoio, essa jornada teria sido impossível. E à minha doce filha, Maria Luiza, que, com sua pureza e compreensão, aceitou minha ausência em tantos momentos. Que este trabalho seja uma prova de que cada sacrifício tem um propósito maior e que, juntos, construímos algo especial para o nosso futuro.

Aos meus colegas e colaboradores de pesquisa, companheiros de tantas batalhas, que dividiram comigo os desafios e as alegrias dessa caminhada. Cada um de vocês deixou uma marca profunda em mim.

Ao meu orientador, Dr. Leonardo de Oliveira Mendes, minha gratidão sincera. Sua confiança no meu trabalho, paciência e orientação cuidadosa foram fundamentais para que este projeto se concretizasse. Obrigada por acreditar no potencial desta pesquisa e por me guiar com sabedoria em cada etapa.

Aos membros da banca de qualificação, minha profunda gratidão pelas contribuições e críticas construtivas. Suas sugestões valiosas e o incentivo durante esse processo foram fundamentais para o aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos e familiares que, com carinho e palavras de encorajamento, me ajudaram a suportar os momentos mais difíceis e tornaram as vitórias ainda mais doces. Vocês foram o meu abrigo nos dias de tempestade e a minha alegria nas horas de sol.

A todos, meu mais profundo e sincero agradecimento. Cada um de vocês faz parte deste sonho realizado.

"O importante é nunca parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir." - Albert Einstein

RESUMO

Caracterização da tríade exposição-gene-doença: impacto dos desreguladores endócrinos no microambiente prostático

Os desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias químicas amplamente distribuídas no ambiente, reconhecidas por sua capacidade de imitar ou inibir a ação de hormônios naturais, com consequências adversas à saúde. A próstata, um órgão hormônio-responsivo, demonstra vulnerabilidade à exposição desses compostos, tornando crucial a investigação de seus efeitos em condições de exposição prolongada. Neste contexto, a presente pesquisa explorou os impactos da exposição aos DEs no microambiente prostático por meio de dois estudos complementares. O primeiro estudo, uma revisão sistemática com metanálise, avaliou a influência da exposição perinatal ao BPA sobre a incidência de lesões pré-neoplásicas na próstata de ratos, com base em quatro estudos pré-clínicos. Os resultados indicaram que o lobo lateral da próstata é particularmente sensível à indução de neoplasia intraepitelial prostática (PIN), especialmente após doses baixas de BPA (0,1 a 2,5 µg/kg), sugerindo uma resposta não monotônica. A metanálise mostrou um *Odds Ratio* combinado de 20,25, indicando um risco elevado de lesões prostáticas em animais expostos ao BPA perinatalmente, especialmente sob estímulo hormonal na fase adulta. No segundo estudo, foi analisada a exposição contínua a uma mistura de 12 DEs, desde o período gestacional até a fase adulta (dia pós-natal 220), em ratos *Sprague-Dawley*. As análises histológicas revelaram a presença de lesões prostáticas significativas, incluindo neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGPIN). A nível molecular, observou-se alteração do perfil transcricional, com enriquecimento de vias relacionadas ao *splicing* de RNA, dobramento proteico, transporte núcleo-citoplasmático e resposta imunológica, refletindo mecanismos adaptativos ao estresse ambiental e processos favorecendo proliferação celular desregulada. A análise de sobrevivência destacou que os genes *ARCN1*, *CD55*, *CRIP2* e *MFSD4A* estão associados a um pior prognóstico em pacientes com câncer de próstata, sugerindo seu potencial como biomarcadores de progressão tumoral. Em conclusão, os achados dos dois estudos oferecem evidências convincentes de que a exposição prolongada a DEs, particularmente durante períodos críticos de

desenvolvimento, compromete a homeostase prostática, favorecendo a formação de lesões pré-cancerígenas e aumentando o risco de progressão para câncer de próstata.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; carcinogênese; próstata; lesões pré-neoplásicas.

ABSTRACT

Characterization of the exposure-gene-disease triad: impact of endocrine disruptors on the prostatic microenvironment

Endocrine disruptors (EDs) are chemical substances widely distributed in the environment, recognized for their ability to mimic or inhibit the action of natural hormones, leading to adverse health outcomes. The prostate, as a hormone-responsive organ, demonstrates a significant vulnerability to the exposure of these compounds, making the investigation of their effects under prolonged exposure conditions crucial. In this context, the present research explored the impacts of ED exposure on the prostatic microenvironment through two complementary studies. The first study, a systematic review with meta-analysis, evaluated the influence of perinatal exposure to Bisphenol A (BPA) on the incidence of preneoplastic lesions in the prostate of Sprague-Dawley rats, based on four preclinical studies. The results indicated that the lateral lobe of the prostate is particularly sensitive to the induction of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), especially after low doses of BPA (0.1 to 2.5 µg/kg), suggesting a non-monotonic response. The meta-analysis showed a combined Odds Ratio of 20.25, indicating a significantly increased risk of prostatic lesions in animals perinatally exposed to BPA, particularly under hormonal stimulation in adulthood. The second study analyzed continuous exposure to a mixture of 12 EDs from the gestational period until adulthood (postnatal day 220) in Sprague-Dawley rats. Histological analyses revealed significant prostatic lesions, including low-grade prostatic intraepithelial neoplasia (LGPIN), focal hyperplasia, and dysplasia, indicating a continuous susceptibility throughout development. At the molecular level, changes in the transcriptional profile were observed, with pathway enrichment related to RNA splicing, protein folding, nucleocytoplasmic transport, and immune response, reflecting cellular adaptive mechanisms to environmental stress as well as processes favoring dysregulated cell proliferation. Survival analysis highlighted that the genes *ARCN1*, *CD55*, *CRIP2*, and *MFSD4A* are associated with a worse prognosis in prostate cancer patients, suggesting their potential as biomarkers for tumor progression. In conclusion, the findings from these two studies provide compelling evidence that prolonged exposure to EDs, particularly during critical periods of development, compromises prostatic homeostasis, favoring the

formation of precancerous lesions and increasing the risk of progression to prostate cancer.

Keywords: Endocrine disruptors; carcinogenesis; prostate; preneoplastic lesions.

LISTA DE SIGLAS

AR	Receptor De Andr�geno
BP	<i>Biological Process</i>
BPA	Bisfenol A
CC	<i>Cellular Component</i>
CEMIB/UNICAM	Centro Multidisciplinar De Investigação Biológica Na �rea De
P	Ciências De Animais De Laboratório
CEUA	Comissão De �tica No Uso De Animais
Chi²	Teste Qui-Quadrado
CTRL	Grupo Controle
DAF	<i>Decay-Accelerating Factor</i>
DAG	Distância Anogenital
DEGs	Genes Diferencialmente Expressos
DEs	Desreguladores Endócrinos
DG	Dia Gestaciona
DP	Lobo Dorsal Da Prostate
DPN	Dia Pós-Natal
EDMix	Grupo Exposto A Mistura De Desreguladores Endocrinos
EMT	Transição Ep�telio-Mesenquimal
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPR30	Receptor De Estrog�nio Acoplado � Proteína G
HE	Hematoxilina E Eosina
HPA	<i>Human Protein Atlas</i>
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IC	Intervalos De Confi��a
IHC	Imuno-Histoquímica
LACTAD	Laboratório Central De Tecnologias De Alto Desempenho Em Ciências Da Vida
LGPIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática De Baixo Grau
LP	Lobo Lateral da Próstata
MF	<i>Molecular Function</i>

MSF	<i>Família Major Facilitator Superfamily</i>
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
OSF	<i>Open Science Framework</i>
PCa	Câncer de Próstata
PIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática
PPAR-γ	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items For Systematic Reviews And Meta-Analyses</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RR	Razão de Risco
SD	Linhagem <i>Sprague-Dawley</i>
T	Testosterona
T+E	Testosterona e Estradiol-17β
TCGA	<i>RNA-Seq Do The Cancer Genome Atlas Program</i>
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
Unoeste	Universidade do Oeste Paulista
VP	Lobos Ventral da Próstata

SUMÁRIO

1	ARTIGO 1- A EXPOSIÇÃO PERINATAL AO BISFENOL A INDUZ LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS PROSTÁTICAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS.....	13
2	ARTIGO 2- EXPOSIÇÃO PROLONGADA À UMA MISTURA DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS ALTERA O PERFIL TRANSCRIONAL DE GENES RELACIOANDOS A MENOR SOBREVIDA NO CÂNCER DE PRÓSTATA	35
	ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	70
	ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF DEVELOPMENTAL ORIGINS OF HEALTH AND DISEASE.....	71
	ANEXO C- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CHEMOSPHERE.....	80

1 ARTIGO 1**A EXPOSIÇÃO PERINATAL AO BISFENOL A INDUZ LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS PROSTÁTICAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA COM METANÁLISE DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS**

Gorzoni, Ana Beatriz Ratto¹; Jesus, Camila Caldeira de²; Durães, Marlon²; Fabregat, Beatriz Díaz; Mendes, Leonardo de Oliveira^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/UNOESTE.

²Faculdade de Medicina de Presidente Prudente – FAMEPP/UNOESTE.

³Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente – UNOESTE.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/UNOESTE.

Email: leonardo@unoeste.br

^aGraduate Program in Health Science, Western São Paulo University (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572 – Bairro do Limoeiro, Presidente Prudente – SP-Brazil;

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

O presente manuscrito está redigido sob as normas da revista *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* (fator de impacto: 1,8)

RESUMO

O Bisfenol A (BPA), um desregulador endócrino (DEs) amplamente difundido no ambiente, é conhecido por mimetizar hormônios esteroides, como os estrogênios, interferindo no comportamento celular e podendo promover o desenvolvimento de câncer em diversos órgãos, especialmente na próstata. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição perinatal ao BPA contribui para o surgimento de lesões pré-neoplásicas na próstata de ratos adultos. Esta revisão sistemática foi conduzida seguindo as diretrizes PRISMA e incluiu estudos pré-clínicos realizados em ratos machos, com ênfase na exposição ao BPA durante o período perinatal. Quatro estudos atenderam aos critérios de inclusão, avaliando os diferentes lobos prostáticos quanto à incidência e severidade das lesões, como neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e adenocarcinomas. Os achados indicaram que o lobo lateral da próstata é particularmente sensível à indução de PIN após a exposição ao BPA, especialmente em doses baixas, e com subsequente estímulo hormonal. A metanálise, realizada apenas em 3 estudos selecionados, revelou um *Odds Ratio* combinado de 20,25, indicando um risco significativamente elevado de lesões PIN nos animais expostos ao BPA no período perinatal. Curiosamente, doses menores de BPA (0,1 a 2,5 µg/kg) foram associadas a lesões mais graves, demonstrando uma resposta não monotônica. Conclui-se que a exposição perinatal ao BPA aumenta a vulnerabilidade da próstata a lesões pré-neoplásicas, especialmente quando há estímulo hormonal na fase adulta, reforçando a urgência de políticas de saúde pública que limitem a exposição a este composto, sobretudo durante períodos críticos de desenvolvimento, como a gestação e os primeiros dias de vida.

Palavras-chave: Bisfenol A; Carcinogênese; Próstata; Lesões Pré-Neoplásicas.

INTRODUÇÃO

Os desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias químicas sintéticas amplamente disseminadas no ambiente, capazes de interferir em processos biológicos essenciais ao se ligarem a receptores hormonais. Entre os diversos tipos de DEs, o Bisfenol A (BPA) se destaca como um dos mais prevalentes, sendo largamente utilizado em produtos industriais, como polycarbonatos, resinas epóxi, revestimentos de latas, embalagens plásticas e utensílios de cozinha.^{1,2} O BPA é produzido globalmente em grandes quantidades, dispersando-se em águas residuais, sedimentos, solos e organismos vivos, incluindo seres humanos. A exposição constante ao BPA, por meio de vias como ingestão, inalação e contato transdérmico, pode resultar em sua bioacumulação no tecido adiposo, com efeitos duradouros, particularmente em fetos em desenvolvimento e recém-nascidos.^{3,4}

A exposição a contaminantes ambientais, como o BPA, tem sido amplamente associada a efeitos adversos na saúde, especialmente quando ocorre em fases críticas do desenvolvimento, como a gestação e lactação. De acordo com o conceito de Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (DOHaD), esses períodos de alta plasticidade biológica são particularmente vulneráveis a alterações ambientais que podem reprogramar permanentemente processos fisiológicos, aumentando a predisposição a doenças crônicas na vida adulta, incluindo obesidade, síndrome metabólica e câncer. No contexto da exposição ao BPA, estudos experimentais sugerem que essas alterações podem impactar diretamente o microambiente prostático, favorecendo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e inflamação crônica, com implicações significativas para a saúde ao longo da vida.⁵

O BPA tem sido amplamente investigado por seus efeitos adversos na saúde, especialmente para a carcinogênese prostática. Estudos indicam que o BPA exerce suas ações através de múltiplos receptores de estrogênio, como ER α , ER β , ER γ , receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPR30) e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ)¹, além de interagir com outras vias de sinalização, influenciando diretamente o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Há uma gama de evidências que mostram que o BPA pode induzir inflamação, estresse oxidativo

e modificações epigenéticas, como a metilação do DNA, que promovem o ambiente ideal para a formação e progressão de tumores prostáticos.⁶

A redução dos níveis de andrógenos, associada ao aumento do estrogênio durante o envelhecimento, é um fator crucial no desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna (HPB). O BPA, atuando como agonista de receptores de estrogênio pode, mesmo em doses ambientalmente relevantes, estimular a proliferação celular e agravar a HPB, possivelmente contribuindo para o desenvolvimento de câncer de próstata. Estudos em modelos animais indicam que a exposição perinatal ao BPA aumenta o risco de hiperplasia prostática e lesões pré-neoplásicas na fase adulta.^{7,8} Esses mecanismos de ação são particularmente relevantes quando considerados no contexto do envelhecimento, em que a redução dos níveis de andrógenos e o aumento do estrogênio podem agravar os efeitos do BPA e promover um ambiente propício ao desenvolvimento de lesões prostáticas.⁹

Evidências científicas têm destacado o papel do BPA na indução de lesões pré-neoplásicas, como a neoplasia intraepitelial prostática (PIN), reconhecida como um dos principais precursores do câncer de próstata. Estudos experimentais em modelos animais demonstram que a exposição ao BPA durante períodos críticos, como a gestação e a lactação, pode alterar significativamente o microambiente prostático, favorecendo o surgimento de PIN em diferentes lobos da próstata.¹⁰ A capacidade do BPA de mimetizar o estrogênio e interagir com múltiplos receptores hormonais sugere que ele crie um ambiente propício para o desenvolvimento dessas lesões, corroborando com dados epidemiológicos que se associam a exposição à DEs com um maior risco de neoplasias prostáticas em humanos.²

Dada a alta prevalência do câncer de próstata, é essencial investigar como fatores ambientais, como a exposição perinatal ao BPA, podem contribuir para o desenvolvimento dessa doença na vida adulta. Esses estudos são cruciais para guiar a implementação de medidas preventivas e a formulação de políticas públicas de saúde que visem reduzir a exposição a substâncias potencialmente carcinogênicas. Assim, o presente estudo teve como objetivo, por meio de uma revisão sistemática com metanálise, avaliar como a exposição perinatal ao BPA contribui para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na próstata de ratos adultos.

METODOLOGIA

Para investigar se a exposição perinatal ao BPA pode induzir lesões pré-neoplásicas na próstata de ratos adultos, foi realizada uma revisão sistemática seguindo as diretrizes PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*).¹¹ O protocolo da revisão foi registrado prospectivamente na plataforma OSF (*Open Science Framework*).

Estratégias de Pesquisa

A pesquisa foi conduzida em quatro bases de dados científicas: *PubMed*, *Scopus*, *Science Direct* e *Embase*, utilizando termos de busca combinados com operadores booleanos (Tabela Suplementar A1). A busca foi orientada por uma questão específica formulada com base na estratégia PICO (População, Intervenção, Comparação e Desfecho): “A exposição perinatal ao BPA contribui para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na próstata de ratos adultos?” A população deste estudo inclui ratos machos adultos expostos ao BPA durante período perinatal, por serem altamente vulneráveis aos efeitos de DEs. A intervenção consiste na exposição perinatal ao BPA, buscando compreender seus efeitos na morfologia prostática. A comparação se deu com grupos controle de ratos não expostos ao BPA, permitindo isolar os efeitos específicos desse DE. O desfecho avaliado foi o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na próstata, como a incidência de PIN, utilizando análises histológicas para verificar as alterações promovidas pela exposição ao BPA. A investigação da exposição perinatal ao BPA em modelos animais no contexto DOHaD é essencial para compreender como DEs podem programar alterações duradouras na próstata, aumentando a vulnerabilidade a lesões ao longo da vida.

Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos apenas artigos de estudos experimentais pré-clínicos que investigaram a exposição perinatal ao Bisfenol A em ratos machos e avaliaram lesões PIN na idade adulta. Para inclusão, os estudos deveriam utilizar metodologias controladas com grupos controle e expostos ao BPA apropriados

e apresentar dados quantitativos mensuráveis. Os critérios de exclusão abrangeram: (1) artigos que não foram redigidos em inglês; (2) estudos que não utilizavam ratos como modelo animal e (3) artigos não originais (artigos de revisão).

Processo de Seleção

A seleção dos estudos realizou-se em três etapas principais: uma triagem inicial dos títulos e resumos para excluir artigos claramente irrelevantes; leitura completa dos artigos potencialmente relevantes para avaliar detalhadamente os critérios de inclusão; e, finalmente, uma avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos, utilizando a ferramenta de avaliação de risco de viés da Cochrane, a *SYRCLE's Risk of Bias*.

Utilizou-se o programa *Rayyan* para a análise dos dados. A triagem e a leitura dos artigos foram realizadas às cegas por três revisores independentes. Os artigos foram carregados no Rayyan, onde cada avaliador marcou os estudos como "incluir", "excluir" ou "talvez". As discrepâncias foram discutidas em reuniões para alcançar um consenso.

Extração de Dados

A extração de dados foi realizada de forma independente por três revisores para garantir precisão e confiabilidade. Os dados extraídos incluíram detalhes sobre autores, ano de publicação, país de publicação, desenho do estudo, espécie animal, via de administração do BPA, dose utilizada, período de exposição e resultados de tipos de lesões histológicas. As discrepâncias na extração de dados foram resolvidas por consenso em reuniões com revisores.

Avaliação da Qualidade dos Estudos

Utilizou-se a ferramenta *SYRCLE's Risk of Bias* para avaliar a qualidade dos estudos, considerando aspectos como sequenciamento aleatório, ocultação da alocação, cegamento, controle de fatores de confusão e completude dos dados.¹² Essa avaliação permitiu identificar potenciais fontes de viés e garantir a inclusão de estudos de alta qualidade.

Síntese dos Dados

A síntese qualitativa envolveu a descrição detalhada dos resultados de cada estudo incluído, permitindo uma comparação crítica e uma interpretação integrada dos achados. Focou-se nas tendências observadas entre os estudos, discutindo como a exposição perinatal ao BPA pode influenciar no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na próstata de ratos adultos.

Além da síntese qualitativa, uma metanálise foi realizada para integrar alguns resultados quantitativos dos estudos incluídos. Utilizou-se o método de Mantel-Haenszel com modelo de efeito fixo para calcular o *Odds Ratio* (OR) e os intervalos de confiança (IC) de 95%, avaliando a associação entre a exposição ao BPA e a ocorrência de lesões PIN em ratos adultos. A heterogeneidade entre os estudos foi avaliada pelo teste qui-quadrado (χ^2) e pelo índice I^2 , com valores de p inferiores a 0,10 indicando heterogeneidade significativa. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software *RevMan*.

RESULTADOS

Seleção de artigos

A busca de dados foi realizada em março de 2024 nas bases de dados *PubMed* (n=35), *Embase* (n=13), *Scopus* (n=25) e *Science Direct* (n=43) resultando 116 artigos selecionados. Após remoção de 2 duplicatas, 114 artigos foram considerados para a triagem inicial.

Durante a triagem inicial, os títulos e resumos dos 114 artigos foram analisados pelos revisores para determinar sua relevância em relação aos critérios de inclusão e exclusão, pela plataforma *Rayyan*. Também foi selecionado um resumo publicado em congresso. Após a triagem por todos os revisores, sete artigos foram selecionados para a leitura completa. Esses estudos foram então analisados em detalhes para confirmar sua elegibilidade. Durante essa etapa, três artigos foram excluídos, por falta de dados na investigação de lesões pré-neoplásicas na próstata de ratos adultos, resultado em quatro estudos incluídos na revisão sistemática final (Figura 1).

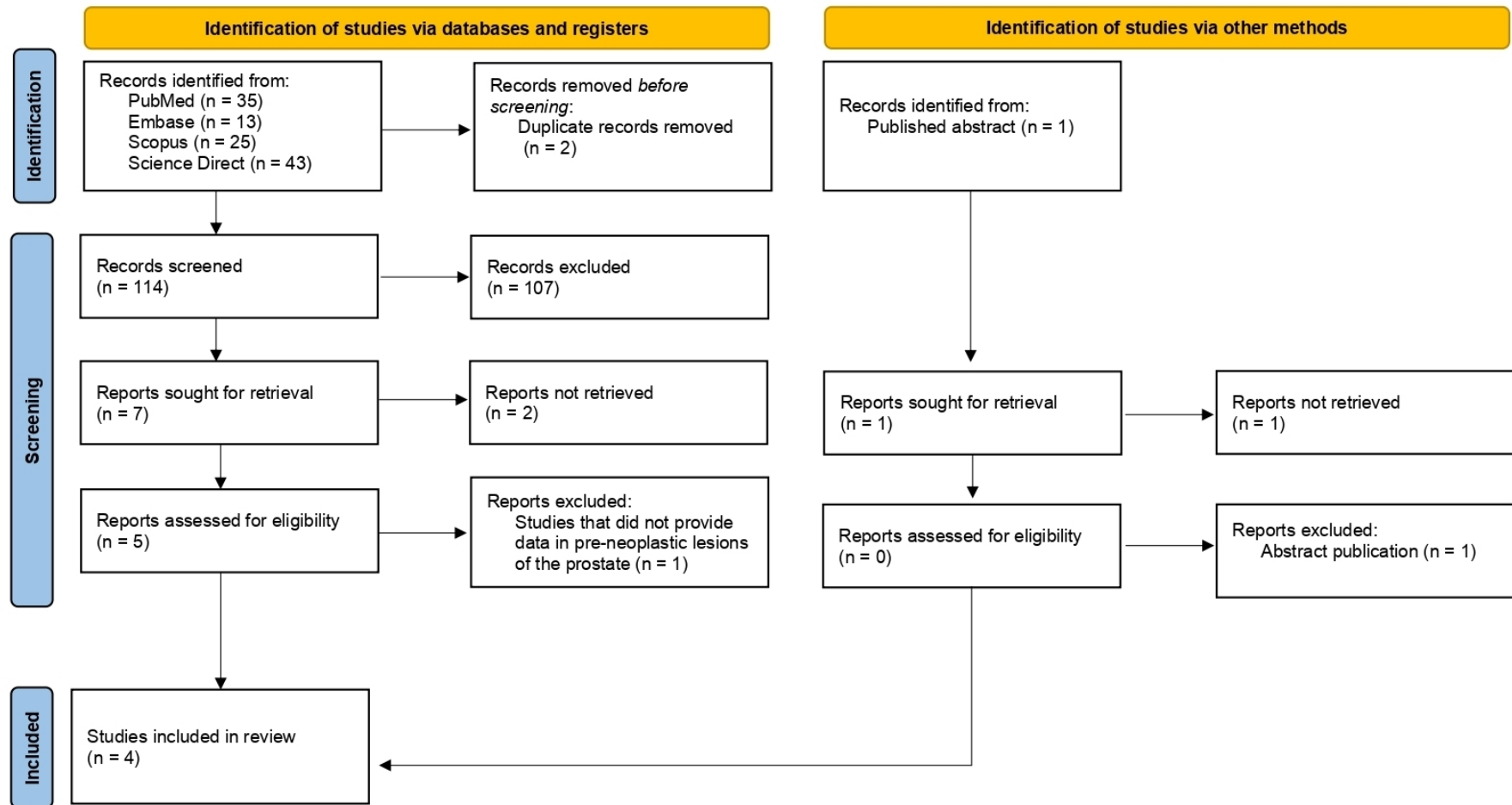


Figura 1. Fluxograma do processo de busca e seleção de dados conforme diretrizes do PRISMA

Avaliação da qualidade dos estudos

A avaliação de risco de viés dos quatro estudos incluídos foi realizada utilizando a ferramenta *SYRCLE's Risk of Bias*. Os estudos demonstraram baixo risco de viés nos domínios de randomização, desvios do tratamento pretendido, medição do desfecho e seleção de resultados relatados. De modo geral, os estudos foram bem conduzidos, com metodologias rigorosas que minimizaram potenciais vieses, reforçando a confiabilidade das conclusões extraídas desta revisão (Figura 2).

		Risk of bias						
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	Overall
Study	Prins et al. (2017)							
	Wong et al. (2015)							
	Prins et al. (2011)							
	Prins et al. (2018)							
		D1: Sequence Generation (Randomization) D2: Allocation Concealment D3: Blinding D4: Incomplete Outcome Data D5: Selective Reporting D6: Other Bias						Judgement Unclear Low

Figura 2. Avaliação de risco de viés dos estudos incluídos na revisão sistemática utilizando a ferramenta *SYRCLE's Risk of Bias*

Características dos estudos selecionados

Os estudos selecionados analisaram o impacto da exposição perinatal ao BPA em ratos *Sprague-Dawley*. Foram utilizadas diferentes dosagens e vias de administração para avaliar o desenvolvimento de lesões prostáticas, incluindo PIN e adenocarcinomas. Em todos os estudos, as lesões prostáticas só foram observadas após o estímulo hormonal de testosterona e estradiol-17 β (T+E). A metodologia dos estudos variou em relação ao momento da exposição, duração do tratamento e análise dos lobos prostáticos.

De modo geral, em todos os artigos incluídos, as lesões PIN foram caracterizadas pela presença de atipias nucleares, incluindo núcleos

aumentados e alongados, hipercromasia e nucléolos proeminentes. Em alguns casos, a formação de padrões cribiformes e o acúmulo celular anômalo foram observados, indicando variações na gravidade das lesões.

Prins et al. (2011)¹³ relataram um aumento significativo de PIN nos lobos ventral (VP) e lateral (LP) da próstata após exposição perinatal a 10µg BPA/kg por via oral e subcutânea. A incidência de PIN no LP atingiu 100% nos ratos expostos por via subcutânea e 90% nos expostos por via oral. No VP, houve um aumento de PIN para 40%, comparado ao grupo controle (18%) em ambos protocolos de exposição. No lobo dorsal (DP), os efeitos foram menos pronunciados, com incidência de 47% e 66% para as exposições subcutânea e oral, respectivamente, em comparação com o grupo controle (33%).

Em estudo subsequente, Wong et al. (2015)¹⁴ demonstraram que a incidência de PIN aumentou de forma dose-dependente após exposição perinatal ao BPA. Nos ratos expostos a 50µg BPA/kg por via oral, a incidência de PIN foi de 91%, enquanto a administração subcutânea de 10 µg/kg resultou em 88% de lesões PIN no LP. A exposição oral às doses menores de 2 e 10 µg/kg por via oral apresentou incidência de 65% e 75%, respectivamente, comparados ao controle de 63%.

No estudo de Prins et al. (2017)¹⁵ foi identificada uma resposta de natureza não-monotônica na incidência de lesões no LP. Foi destacado que doses menores de BPA (0,1 µg/kg) foram associadas a maior incidência de PIN em comparação com algumas doses mais altas. A incidência variou entre 75% e 100% nas diferentes dosagens de BPA (0,1 a 5000 µg/kg) por via subcutânea, com maior predominância de lesões nas doses mais baixas.

Mais recentemente, Prins et al. (2018)⁷ mostraram que a exposição contínua desde o 6º dia gestacional (DG6) até o 21º dia pós-natal (DPN21) levou a uma alta incidência de PIN. Essas lesões encontravam-se especialmente no LP, com 100% de incidência nas doses de 2,5 µg/kg e nas doses mais altas (2500 e 25000 µg/kg) por via oral. A dose de 25 µg/kg apresentou uma redução na incidência para 50%, enquanto o controle teve incidência de 88% (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos estudos incluídos na revisão sistemática

Autores (Ano)	Título	País	Tipo de Estudo	Número de Ratos (n)	Grupo Controle	Exposição (BPA)	Estímulo hormonal	Período de Exposição	Idade da eutanásia do animal	Desfechos (% PIN)
Prins et al. (2011)	Serum Bisphenol A Pharmacokinetics and Prostate Neoplastic Responses following Oral and Subcutaneous Exposures in Neonatal Sprague-Dawley Rats	EUA	Experimental	15 a 25 filhotes por grupo	Veículo (Óleo de milho desprovido de tocoferol)	Oral e Subcutânea (10 µg/kg)	Após 16 semanas com cápsula de testosterona e estradiol-17β	DPN 1, 3 e 5	7 meses	- Lobo Ventral: Veículo (óleo de milho): 18%; BPA subcutânea: 40%; BPA oral: 40% - Lobo Lateral: Veículo (óleo de milho): 64%; BPA subcutânea: 100%; BPA oral: 90% - Lobo Dorsal: Veículo (óleo de milho): 33%; BPA subcutânea: 47%; BPA oral: 66%
Wong et al. (2015)	Identification of Secretoglobin Scgb2a1 as a target for developmental reprogramming by BPA in the rat prostate	EUA	Experimental	6 filhotes por grupo	Veículo (óleo de gergilim)	Oral (2, 10, e 50 µg/kg), Subcutânea (10 µg/kg)	Após 70 dias de vida com cápsula de testosterona e estradiol-17β	DPN 1, 3 e 5	12 meses	- Lobo Lateral: Veículo (óleo de gergilim): 63%; BPA oral 2 mg/kg: 65%; BPA oral 10 mg/kg: 75%; BPA oral 50 mg/kg: 91%; BPA subcutâneo 10 mg/kg: 88%
Prins et al. (2017)	Prostate Cancer Risk and DNA Methylation Signatures in Aging Rats following Developmental BPA Exposure: A Dose-Response Analysis	EUA	Experimental	22-32 filhotes por grupo	Veículo (óleo de milho desprovido de tocoferol), doses baixas e altas de T e E2 (câncer)	Subcutânea (0,1; 1; 10, 100 e 5000 µg/kg)	Após 90 dias de vida com cápsula de testosterona e estradiol-17β	DPN 1, 3 e 5	7 meses	- Lobo lateral: Veículo + cápsula vazia: 20%; Veículo + T+E: 67%; E2 baixa dose + T+E: 62%; E2 alta dose + T+E: 91%; BPA 0,1 µg/kg: 100%; BPA 1,0 µg/kg: 89%; BPA 10 µg/kg: 100%; BPA 100 µg/kg: 75%; BPA 5000 µg/kg: 90%.
Prins et al. (2018)	Evaluation of Bisphenol A (BPA) Exposures on Prostate Stem Cell Homeostasis and Prostate Cancer Risk in the NCTR-Sprague-Dawley Rat: An NIEHS/FDA CLARITY-BPA Consortium Study	EUA	Experimental	20 filhotes por grupo	Veículo (óleo de milho) e doses de Estradiol (EE)	Oral (2,5; 25; 250; 2500 e 25000 µg/kg)	Após 90 dias de vida com cápsula de testosterona e estradiol-17β	DG6 até DPN21.	12 meses	- Lobo lateral: Veículo: 88%; EE: 100%; 2,5 µg/kg BPA: 100%; 25 µg/kg BPA: 50%; 250 µg/kg BPA: 92%; 2500 µg/kg BPA: 100% 25000 µg/kg BPA: 100%

Metanálise

Dos 3 estudos incluídos para metanálise, foi identificada uma forte associação entre a exposição perinatal de BPA e a ocorrência de lesões PIN em ratos adultos. O OR combinado foi de 20,25 (IC 95%: 4,24 – 96,79), indicando um risco significativamente maior de desenvolvimento de lesões PIN nos animais expostos ao BPA em comparação com o grupo controle. A ausência de heterogeneidade significativa entre os estudos ($\text{Chi}^2 = 1,25$; $\text{df} = 2$; $p = 0,54$; $I^2 = 0\%$) sugere consistência entre os resultados dos estudos incluídos. Importante destacar que somente os estudos de Prins et al. (2011)¹³, Wong et al. (2015)¹⁴ e Prins et al. (2017)¹⁵ foram incluídos na análise, considerando-se exclusivamente os dados referentes à dose de 10 μg BPA/kg administrada por via subcutânea, visto que essa dose e o regime de exposição perinatal foram os únicos consistentes entre os estudos (Figura 3).

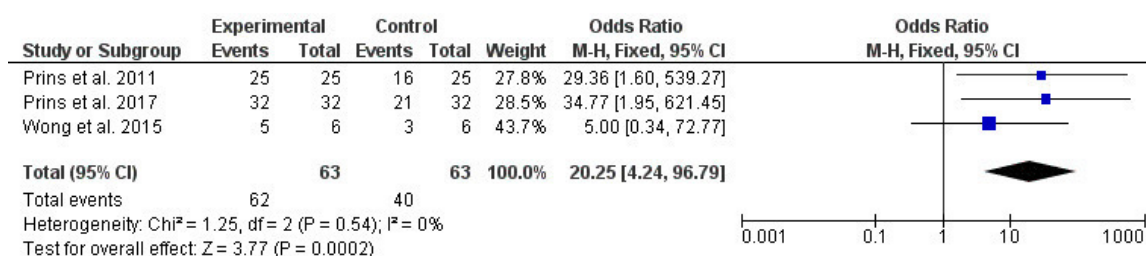


Figura 3. Metanálise da associação entre exposição ao BPA e ocorrência de lesões PIN em ratos adultos. A análise foi realizada utilizando o método de Mantel-Haenszel com modelo de efeito fixo. Os estudos incluídos (Prins et al. 2011, Prins et al. 2017 e Wong et al. 2015) utilizaram a dose de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ administrada por via subcutânea durante a exposição perinatal.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que a exposição perinatal ao BPA predispõe o microambiente prostático ao desenvolvimento de lesões, especialmente PIN, evidenciando o papel reprogramador deste DE. Todos os estudos incluídos na revisão sistemática concordam que o estímulo hormonal com T + E é necessário para que ocorra a manifestação das lesões. No geral, a incidência de lesões PIN variou significativamente entre os lobos da próstata, sendo mais evidente na próstata lateral (LP), seguido da próstata ventral (VP) e dorsal (LD).^{7,13-15} Estes resultados corroboram a hipótese de que a exposição perinatal ao BPA resulta em uma suscetibilidade diferencial dos lobos

prostáticos, dependente do grau de exposição e da resposta hormonal subsequente.

A análise dos estudos permitiu compreender de forma robusta o impacto da exposição perinatal ao BPA em diferentes doses e vias de administração, além das condições necessárias para o desenvolvimento de lesões prostáticas. Uma revisão abrangente conduzida por Bergengren et al. (2022)¹⁶ reforça que a exposição a DEs, como o BPA, está associada a mudanças epigenéticas e ao aumento da susceptibilidade a lesões neoplásicas na próstata. Além disso, destaca que a prevalência do câncer de próstata e suas complicações são maiores em homens expostos a esses fatores ambientais durante janelas críticas de desenvolvimento. Ademais, os estudos de Prins et al. (2011, 2017, 2018)^{7,13,15} demonstram que doses ambientalmente relevantes de BPA (a partir de 0,1µg BPA/kg) são capazes de promover reprogramações epigenéticas duradouras que aumentam a predisposição ao desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na fase adulta. Esses achados indicam que os resultados desta revisão são aplicáveis a cenários reais de exposição humana, considerando a presença contínua de BPA no ambiente e a onipresença da exposição. Os resultados também se alinham ao conceito de DOHaD, que enfatiza o impacto de exposições ambientais durante janelas críticas de desenvolvimento, como a gestação e a lactação, na reprogramação de sistemas biológicos. No contexto da exposição ao BPA, essa reprogramação pode ser mediada por mecanismos epigenéticos que alteram a expressão de genes envolvidos na proliferação celular e no microambiente prostático, favorecendo o surgimento de lesões pré-neoplásicas.¹⁷

É importante destacar que, entre os estudos incluídos, observou-se falta de padronização das doses e das vias de exposição ao BPA, o que impediu a inclusão de todos os estudos na metanálise. Apenas três estudos¹³⁻¹⁵ apresentaram dose comum de 10µg BPA/kg por via subcutânea, permitindo uma análise comparativa direta. Wong et al. (2015)¹⁴ utilizaram doses variando de 2 a 50 µg/kg, enquanto Prins et al. (2017)¹⁵ investigaram doses de 0,1 até 5000 µg/kg, contribuindo para uma variabilidade dos achados e limitando a robustez dos resultados combinados.

Por outro lado, em todos os estudos analisados, o LP mostrou-se o mais suscetível a lesões PIN e adenocarcinomas após a exposição perinatal ao

BPA^{7,13-15}. Essa diferença na resposta entre os lobos prostáticos pode ser atribuída a variações na densidade de receptores hormonais e à sensibilidade específica de cada região. Notavelmente, a regulação dos receptores androgênicos no LP possui características peculiares, sendo menos dependente dos andrógenos e potencialmente modulado por outros hormônios, como o estrógeno¹⁸. Além disso, outro ponto favorável, foram os estudos que padronizaram a dose de 10 µg/kg de BPA por via subcutânea e forneceram resultados consistentes, permitindo uma comparação direta dos efeitos do BPA em diferentes experimentos e viabilizando a realização de metanálises. Essa dose padronizada demonstrou ser eficaz na reprodução de lesões pré-neoplásicas e adenocarcinomas, particularmente no lobo lateral, reforçando a ideia de que essa região da próstata é mais vulnerável aos efeitos pró-tumorais do BPA. Essa dose reproduz exposições ambientalmente relevantes, refletindo os níveis observados em humanos expostos a esse DE.

A metanálise realizada revelou uma forte associação entre a exposição perinatal ao BPA e o desenvolvimento de lesões PIN na próstata. Evidenciou resultados consistentes quanto à ocorrência de efeitos adversos, refletindo a coerência dos achados e contribuindo para uma visão mais integrada dos impactos analisados. Além disso, a ausência de heterogeneidade sugere uma uniformidade dos resultados entre os estudos incluídos, reforçando a convergência dos efeitos observados. No entanto, essa análise possui importantes limitações, como o pequeno número de estudos incluídos, o que reduz a robustez das conclusões e pode introduzir um viés de amostragem. Observa-se que os intervalos de confiança amplos indicam incerteza nas estimativas, e o uso de um modelo de efeito fixo pode não ser apropriado diante de possíveis diferenças metodológicas entre os estudos. Ademais, a avaliação de viés de publicação é comprometida pelo baixo número de estudos, tornando difícil a confirmação da ausência de viés. Portanto, apesar da significância estatística observada, é essencial interpretar os resultados com cautela. O fato de apenas doses subcutâneas de 10µg BPA/kg¹³⁻¹⁵ terem sido incluídas na metanálise evidencia a necessidade de mais estudos padronizados para avaliar os efeitos do BPA por diferentes vias de exposição e em diferentes momentos do desenvolvimento.

Embora os resultados desta revisão sejam aplicáveis em contextos de exposição perinatal ao BPA seguida por estímulos hormonais na fase adulta, existem situações em que os achados não são diretamente aplicáveis. Por exemplo, quando não ocorre exposição hormonal adicional na fase adulta, o BPA, por si só, não é suficiente para induzir lesões prostáticas significativas. Estudos prévios demonstraram que a administração prolongada de T+E em ratos resultou em uma alta incidência de adenocarcinomas ductais na próstata, indicando que a exposição hormonal tem um papel crucial na carcinogênese prostática^{19,20}. Essas evidências sugerem que o ambiente hormonal é um fator determinante para a progressão das lesões prostáticas. Essa exposição hormonal poderia ser padronizada para garantir a reprodutibilidade dos achados, permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à progressão de lesões pré-neoplásicas e à indução do câncer prostático.

É importante explicar que a resposta não monotônica ao BPA indica que a relação entre dose e efeito não segue um padrão linear, o que é um comportamento esperado dos DEs e complica a extrapolação dos resultados para diferentes contextos de exposição humana. Observou-se que tanto doses muito baixas (0,1 µg/kg) quanto doses muito altas de BPA induziram lesões PIN significativas, especialmente em combinação com T+E, sugerindo que até mesmo exposições a níveis ambientalmente relevantes podem trazer consequências importantes para a saúde prostática. Em contraste, as doses intermediárias de BPA não mostraram diferença significativa. Esse comportamento, onde pequenas e grandes doses são mais prejudiciais do que doses médias, desafia as abordagens tradicionais de avaliação de risco, que normalmente assumem uma relação dose-resposta linear. Portanto, é essencial considerar essa complexidade ao avaliar os riscos associados à exposição ao BPA, especialmente em exposições crônicas e ambientalmente relevantes.

Desta forma, os resultados deste estudo reforçam o papel da exposição perinatal ao BPA na predisposição do microambiente prostático a lesões neoplásicas, particularmente quando ocorre estímulo hormonal subsequente. No entanto, é fundamental integrar as limitações discutidas, como a padronização das doses e metodologias, para garantir a robustez dos achados e possibilitar análises combinadas mais precisas, como a metanálise

apresentada. Além disso, a evidência de respostas não monotônicas e a importância de doses baixas destacam a complexidade dos mecanismos de ação do BPA e a necessidade de uma avaliação cuidadosa dos riscos associados à exposição perinatal a esse composto. Estes resultados são relevantes para modelos experimentais e para a extrapolação dos riscos associados à exposição humana, apontando para a necessidade de políticas de controle mais rigorosas para minimizar os riscos de exposição ao BPA.

CONCLUSÃO

Os achados deste estudo indicam que a exposição perinatal ao BPA contribui para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas na próstata de ratos adultos, especialmente quando associada a estímulos hormonais subsequentes. A resposta não monotônica ao BPA, onde doses baixas podem causar efeitos significativos, demonstra a complexidade do risco associado a esse desregulador endócrino. Esses resultados, no contexto do conceito DOHaD, reforçam a importância de períodos críticos de desenvolvimento como janelas de vulnerabilidade a exposições ambientais. Assim, é essencial implementar políticas públicas que limitem a exposição ao BPA, reduzindo o risco de alterações neoplásicas na próstata durante o envelhecimento.

Conflito de interesse:

Os autores declaram que não há conflito de interesse

Financiamento:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP:
2019/24044-0

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
CAPES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. F. Acconcia, V. Pallottini, & M. Marino, Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, **13** (2015). <https://doi.org/10.1177/1559325815610582>.

2. A. Shafei, M. M. Ramzy, A. I. Hegazy, A. K. Husseny, U. G. EL-hadary, M. M. Taha, & A. A. Mosa, The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. *Gene*, **647** (2018) 235–243. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2018.01.016>.
3. M. Nagarajan, G. B. Maadurshni, & J. Manivannan, Bisphenol A (BPA) exposure aggravates hepatic oxidative stress and inflammatory response under hypertensive milieu - Impact of low dose on hepatocytes and influence of MAPK and ER stress pathways. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **183** (2024). <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2023.114197>.
4. B. Yilmaz, H. Terekeci, S. Sandal, & F. Kelestimur, Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, **21** (2020) 127–147. <https://doi.org/10.1007/S11154-019-09521-Z>.
5. D. L. Almeida, A. Pavanello, L. P. Saavedra, T. S. Pereira, M. A. A. De Castro-Prado, & P. C. De Freitas Mathias, Environmental monitoring and the developmental origins of health and disease. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, **10** (2019) 608–615. <https://doi.org/10.1017/S2040174419000151>,.
6. I. Cimmino, F. Fiory, G. Perruolo, C. Miele, F. Beguinot, P. Formisano, & F. Oriente, Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *International journal of molecular sciences*, **21** (2020) 1–22. <https://doi.org/10.3390/IJMS21165761>.
7. G. S. Prins, W. Y. Hu, L. Xie, G. Bin Shi, D. P. Hu, L. Birch, & M. C. Bosland, Evaluation of Bisphenol A (BPA) Exposures on Prostate Stem Cell Homeostasis and Prostate Cancer Risk in the NCTR-Sprague-Dawley Rat: An NIEHS/FDA CLARITY-BPA Consortium Study. *Environmental health perspectives*, **126** (2018). <https://doi.org/10.1289/EHP3953>.
8. J. A. J. A. Taylor, M. B. M. B. Jones, C. L. C. L. Besch-Williford, A. F. A. F. Berendzen, W. A. W. A. Ricke, & F. S. F. S. Vom Saal, Interactive Effects of Perinatal BPA or DES and Adult Testosterone and Estradiol

- Exposure on Adult Urethral Obstruction and Bladder, Kidney, and Prostate Pathology in Male Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (2020) 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms21113902>.
9. A. Vermeulen, J. M. Kaufman, S. Goemaere, & I. Van Pottelberg, Estradiol in elderly men. *Aging Male*, **5** (2002) 98–102. <https://doi.org/10.1080/tam.5.2.98.102>.
 10. J. J. Heindel, S. Belcher, J. A. Flaws, G. S. Prins, S.-M. Ho, J. Mao, H. B. Patisaul, W. Rieke, C. S. Rosenfeld, A. M. Soto, F. S. vom Saal, & R. T. Zoeller, Data integration, analysis, and interpretation of eight academic CLARITY-BPA studies. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.y.)*, **98** (2020) 29–60. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.05.014>.
 11. M. J. Page, J. E. McKenzie, P. M. Bossuyt, I. Boutron, T. C. Hoffmann, C. D. Mulrow, L. Shamseer, J. M. Tetzlaff, E. A. Akl, S. E. Brennan, R. Chou, J. Glanville, J. M. Grimshaw, A. Hróbjartsson, M. M. Lalu, T. Li, E. W. Loder, E. Mayo-Wilson, S. McDonald, L. A. McGuinness, L. A. Stewart, J. Thomas, A. C. Tricco, V. A. Welch, P. Whiting, & D. Moher, The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *PLoS Medicine*, **18** (2021). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1003583>.
 12. C. R. Hooijmans, M. M. Rovers, R. B. M. De Vries, M. Leenaars, M. Ritskes-Hoitinga, & M. W. Langendam, SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC medical research methodology*, **14** (2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.
 13. G. S. Prins, S. H. Ye, L. Birch, S. mei Ho, & K. Kannan, Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, **31** (2011) 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2010.09.009>.
 14. R. L. Y. Wong, Q. Wang, L. S. Treviño, M. C. Bosland, J. Chen, M. Medvedovic, G. S. Prins, K. Kannan, S. M. Ho, & C. L. Walker, Identification of secretoglobin Scgb2a1 as a target for developmental reprogramming by BPA in the rat prostate. *Epigenetics*, **10** (2015) 127–134. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1009768>.
 15. G. S. Prins, S. H. Ye, L. Birch, X. Zhang, A. Cheong, H. Lin, E. Calderon-

- Gierszal, J. Groen, W. Y. Hu, S. M. Ho, & R. B. Van Breemen, Prostate Cancer Risk and DNA Methylation Signatures in Aging Rats following Developmental BPA Exposure: A Dose-Response Analysis. *Environmental health perspectives*, **125** (2017). <https://doi.org/10.1289/EHP1050>.
16. O. Bergengren, K. R. Pekala, K. Matsoukas, J. Fainberg, S. F. Mungovan, O. Bratt, F. Bray, O. Brawley, A. N. Luckenbaugh, L. Mucci, T. M. Morgan, & S. V. Carlsson, 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors-A Systematic Review. *European urology*, **84** (2023) 191–206. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2023.04.021>.
 17. M. A. Romano, A. J. Martino-Andrade, P. C. de F. Mathias, L. F. Barella, & R. M. Romano, Editorial: Endocrine Disruption in Light of Dohad: The Challenges of Contaminants of Emerging Concern in Food and Water. *Frontiers in Endocrinology*, **13** (2022) 898736. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.898736>.
 18. G. S. Prins, Differential regulation of androgen receptors in the separate rat prostate lobes: Androgen independent expression in the lateral lobe. *Journal of Steroid Biochemistry*, **33** (1989) 319–326. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(89\)90319-1](https://doi.org/10.1016/0022-4731(89)90319-1).
 19. W. Y. Hu, G. Bin Shi, H. M. Lam, D. P. Hu, S. M. Ho, I. C. Madueke, A. Kajdacsy-Balla, & G. S. Prins, Estrogen-initiated transformation of prostate epithelium derived from normal human prostate stem-progenitor cells. *Endocrinology*, **152** (2011) 2150–2163. <https://doi.org/10.1210/EN.2010-1377>.
 20. M. C. Bosland, H. Ford, & L. Horton, Induction at high incidence of ductal prostate adenocarcinomas in NBL/Cr and Sprague-Dawley Hsd:SD rats treated with a combination of testosterone and estradiol-17 beta or diethylstilbestrol. *Carcinogenesis*, **16** (1995) 1311–1317. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/16.6.1311>.

Tabela suplementar 1. Estratégias de busca nas bases de dados Medline/PubMed; Embase; Scopus e Science Direct

Estratégia Geral de Pesquisa
Bisphenol A
"Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate" OR Adaptic OR "Bis GMA" OR "Bis GMA Polymer" OR "Bis GMA Resin" OR "Bis(Phenol A-Glycidyl Methacrylate)" OR "Bis-GMA" OR "Bis-GMA Polymer*" OR "Bis-GMA Resin*" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate Homopolymer" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate Polymer" OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate Homopolymer" OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate Polymer" OR "Concise Composite Resin" OR "Concise Composite Resins" OR "Concise Enamel Bond" OR "Concise Enamel Bond System" OR "Concise Resin*" OR "Concise White Sealant" OR "Conclude Composite Resin" OR "Conclude Resin" OR Delton OR "EpoxyLite 9075" OR EpoxyLite-9075 OR EpoxyLite9075 OR "Kerr Sealer" OR "Nuva Seal" OR Nuva-Seal OR NuvaSeal OR "Panavia Opaque" OR "Poly(Bis-GMA)" OR Retroplast OR Silux OR BPA OR "2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane" OR "Bisphenol A"
Câncer de Próstata
"prostatic neoplasms" OR "Cancer of Prostate" OR "Cancer of the Prostate" OR "Prostate Cancer" OR "Prostate Cancers" OR "Prostate Neoplasm" OR "Prostate Neoplasms" OR "Prostatic Cancer" OR "Prostatic Cancers" OR "Prostatic Neoplasm"
Ratos (modelo animal)
Rats OR "Laboratory Rat" OR "Laboratory Rats" OR Rat OR Rattus OR "Rattus norvegicus" OR Mice OR "Laboratory Mice" OR "Laboratory Mouse" OR Mouse
MEDLINE\PubMed (Via National Medicine Library)
Search #1
"Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate"[mesh] OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate" OR Adaptic OR "Bis GMA" OR "Bis GMA Polymer" OR "Bis GMA Resin" OR "Bis(Phenol A-Glycidyl Methacrylate)" OR "Bis-GMA" OR "Bis-GMA Polymer" OR "Bis-GMA Polymers" OR "Bis-GMA Resin" OR "Bis-GMA Resins" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate Homopolymer" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate Polymer" OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate Homopolymer" OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate Polymer" OR "Concise Composite Resin" OR "Concise Composite Resins" OR "Concise Enamel Bond" OR "Concise Enamel Bond System" OR "Concise Resin" OR "Concise Resins" OR "Concise White Sealant" OR "Conclude Composite Resin" OR "Conclude Resin" OR Delton OR "EpoxyLite 9075" OR EpoxyLite-9075 OR EpoxyLite9075 OR "Kerr Pit and Fissure Sealant" OR "Kerr Sealer" OR "Nuva Seal" OR Nuva-Seal OR NuvaSeal OR "Panavia Opaque" OR "Poly(Bis-GMA)" OR Retroplast OR Silux OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate" OR "bisphenol A" OR BPA OR "2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane" OR "Bisphenol A"
Search #2
"prostatic neoplasms"[mesh] OR "Cancer of Prostate" OR "Cancer of the Prostate" OR "Prostate Cancer" OR "Prostate Cancers" OR "Prostate Neoplasm" OR "Prostate Neoplasms" OR "Prostatic Cancer" OR "Prostatic Cancers" OR "Prostatic Neoplasm"
Search #3
Rats[mesh] OR "Laboratory Rat" OR "Laboratory Rats" OR Rat OR Rattus OR "Rattus

norvegicus"
Search #4
Mice[mesh] OR "Laboratory Mice" OR "Laboratory Mouse" OR Mouse
Search #5
#1 and #2 and (#3 or #4)
EMBASE (Elsevier)
Search #1
'4,4` isopropylidenediphenol'/exp OR '2, 2 bis (4 hydroxyphenyl) propane' OR '4, 4` isopropylidene diphenol' OR 'bisphenol a' OR '4,4` isopropylidenediphenol' OR 'bisphenol a bis(2 hydroxypropyl) ether dimethacrylate'/exp OR '2, 2 bis [4 (2 methacryloyloxypropoxy) phenyl] propane' OR '4, 4` isopropylidenediphenol methacrylic acid diglycidyl ether' OR 'bisphenol a bis (glycidylmethacrylate)' OR 'bisphenol a diglycidylmethacrylate' OR 'bisphenol a glycidyl methacrylate' OR 'bisphenol a-glycidyl methacrylate' OR 'isopropylidenebis (3 phenoxy 2 hydroxytrimethylene) dimethacrylate' OR 'bisphenol a bis(2 hydroxypropyl) ether dimethacrylate'
Search #2
'prostate tumor'/exp OR 'neoplasia of the prostate' OR 'neoplasm of the prostate' OR 'neoplastic prostate' OR 'neoplastic prostates' OR 'neoplastic prostatic' OR 'prostate gland tumor' OR 'prostate gland tumour' OR 'prostate neoplasia' OR 'prostate neoplasm' OR 'prostate tumorigenesis' OR 'prostate tumour' OR 'prostatic neoplasia' OR 'prostatic neoplasm' OR 'prostatic neoplasms' OR 'prostatic tumor' OR 'prostatic tumorigenesis' OR 'prostatic tumour' OR 'tumor of the prostate' OR 'tumorigenesis of the prostate' OR 'tumour of the prostate' OR 'prostate tumor'
Search #3
'rat'/exp OR 'rats' OR 'rattus' OR 'rat' OR 'mouse'/exp OR 'mice' OR 'mus (genus)' OR 'newborn mice' OR 'mouse'
Search #4
#1 AND #2 AND #3
Search #5
#4 AND [embase]/lim NOT ([embase]/lim AND [medline]/lim)
SCOPUS (Elsevier)
Search #1

"Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate" OR adaptic OR "Bis GMA" OR "Bis GMA Polymer" OR "Bis GMA Resin" OR "Bis(Phenol A-Glycidyl Methacrylate)" OR "Bis-GMA" OR "Bis-GMA Polymer*" OR "Bis-GMA Resin*" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate Homopolymer" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate Polymer" OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate Homopolymer" OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate Polymer" OR "Concise Composite Resin" OR "Concise Composite Resins" OR "Concise Enamel Bond" OR "Concise Enamel Bond System" OR "Concise Resin*" "Concise White Sealant" OR "Conclude Composite Resin" OR "Conclude Resin" OR delton OR "EpoxyLite 9075" OR epoxyLite-9075 OR epoxyLite9075 OR "Kerr Sealer" OR "Nuva Seal" OR nuva-seal OR nuvaseal OR "Panavia Opaque" OR "Poly(Bis-GMA)" OR retroplast OR silux OR bpa OR "2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane" OR "Bisphenol A"

Search #2

"prostatic neoplasms" OR "Cancer of Prostate" OR "Cancer of the Prostate" OR "Prostate Cancer" OR "Prostate Cancers" OR "Prostate Neoplasm" OR "Prostate Neoplasms" OR "Prostatic Cancer" OR "Prostatic Cancers" OR "Prostatic Neoplasm"

Search #3

rats OR "Laboratory Rat" OR "Laboratory Rats" OR rat OR rattus OR "Rattus norvegicus" OR mice OR "Laboratory Mice" OR "Laboratory Mouse" OR mouse

Search #4

(ALL ("Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate" OR Adaptic OR "Bis GMA" OR "Bis GMA Polymer" OR "Bis GMA Resin" OR "Bis (Phenol A-Glycidyl Methacrylate) " OR "Bis-GMA" OR "Bis-GMA Polymer*" OR "Bis-GMA Resin*" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate Homopolymer" OR "Bisphenol A Glycidyl Methacrylate Polymer" OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate Homopolymer" OR "Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate Polymer" OR "Concise Composite Resin" OR "Concise Composite Resins" OR "Concise Enamel Bond" OR "Concise Enamel Bond System" OR "Concise Resin*" "Concise White Sealant" OR "Conclude Composite Resin" OR "Conclude Resin" OR Delton OR "EpoxyLite 9075" OR EpoxyLite-9075 OR epoxyLite OR "Kerr Sealer" OR "Nuva Seal" OR Nuva-Seal OR uveal OR "Panavia Opaque" OR "Poly (Bis-GMA) " OR Retroplast OR Silux OR BPA OR "2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane" OR "Bisphenol A") AND ALL ("prostatic neoplasms" OR "cancer off prostate" OR "cancer off the prostate" OR "Prostate Cancer" OR "Prostate Cancers" OR "Prostate Neoplasm" OR "Prostate Neoplasms" OR "Prostatic Cancer" OR "Prostatic Cancers" OR "Prostatic Neoplasm") AND ALL (Rats OR "Laboratory Rat" OR "Laboratory Rats" OR Rat OR Rattus OR "Rattus norvegicus" OR Mice OR "Laboratory Mice" OR "Laboratory Mouse" OR Mouse))

SCIENCE DIRECT

("Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate" OR "Bisphenol A") AND ("prostatic neoplasms" OR "Cancer of Prostate") AND (Rats OR Rattus OR Mice OR Mouse)

2 ARTIGO 2

**EXPOSIÇÃO PROLONGADA À UMA MISTURA DE
DESREGULADORES ENDÓCRINOS ALTERA O PERFIL
TRANSCRICIONAL DE GENES RELACIONADOS A MENOR
SOBREVIDA NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

^aGorzoni, A.B.R.; ^bMareco, E.A.; ^bOliveira, V.H.G.; ^cMettifogo, O.S.; ^aSousa, T.C.; ^aHinokuma, K.D.; ^aRicardo, M.L.S.; ^dAquino, A.M.; ^eScarano, W.R.; ^{a,f}Mendes, L.O.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

^cFaculdade de Medicina de Presidente Prudente – FAMEPP/UNOESTE

^dHenry Ford Cancer Institute, Henry Ford Health, Detroit, MI, Estados Unidos

^eDepartamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências de Botucatu, IBB/UNESP, Botucatu, SP, Brasil

^fPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

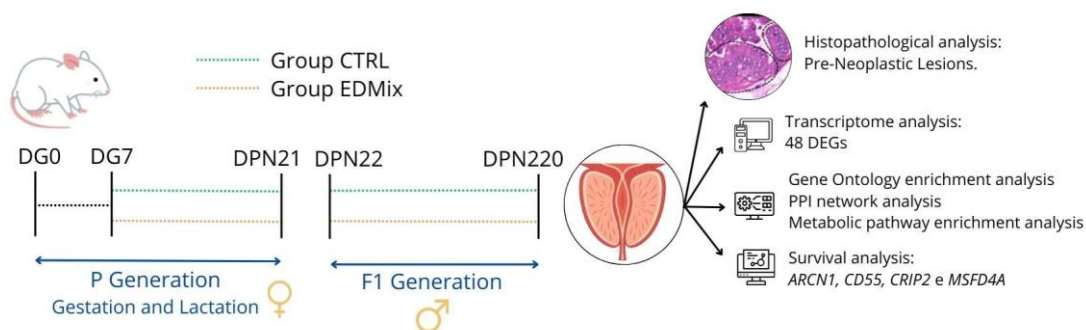
Email: leonardo@unoeste.br

O presente manuscrito está redigido sob as normas da revista *Chemosphere* (fator de impacto: 8,1)

HIGHLIGHTS

- A exposição prolongada a uma mistura de desreguladores endócrinos (DEs) desde o período gestacional até a idade adulta promove alterações histológicas e moleculares significativas na próstata ventral de ratos.
- A análise histopatológica revelou uma alta incidência de neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGPIN) nos animais expostos à mistura de DEs.
- A análise de expressão diferencial identificou 48 genes diferencialmente expressos, com enriquecimento de vias críticas associadas à homeostase celular, como *splicing* de RNA, dobramento proteico e respostas imunológicas.
- Os genes *ARCN1*, *CD55*, *CRIP2* e *MFSD4A* foram correlacionados a menor sobrevida em pacientes com câncer de próstata, destacando seu potencial como biomarcadores prognósticos.
- Os achados sugerem que a exposição prolongada a DEs pode acelerar a progressão de lesões prostáticas pré-neoplásicas para estágios mais avançados, reforçando a necessidade de estratégias preventivas.

GRAPHICAL ABSTRACT



RESUMO

A próstata, glândula acessória do sistema reprodutor masculino, é altamente hormônio-responsiva e suscetível a alterações ambientais. Fatores externos, como a exposição a desreguladores endócrinos (DEs), podem interferir significativamente nesses processos. Este estudo teve como objetivo investigar as alterações histológicas e transcricionais na próstata de ratos machos expostos a uma mistura de 12 DEs, desde o período gestacional até a idade adulta. Foram utilizados 36 ratos Sprague-Dawley expostos à mistura de DEs do dia gestacional 7 ao dia pós-natal 220, seguidos por análises de transcriptoma e avaliação histopatológica. Foram verificadas alterações na histoarquitetura prostática, incluindo neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGPIN), hiperplasia focal e displasia. A nível molecular, a exposição prolongada impactou o perfil transcricional prostático, com enriquecimento de vias relacionadas ao splicing de RNA, dobramento proteico, transporte núcleo-citoplasmático e resposta imunológica. Essas alterações refletem mecanismos adaptativos celulares ao estresse ambiental, mas também indicam processos que favorecem a proliferação celular desregulada e a progressão tumoral. Adicionalmente, uma análise de sobrevida utilizando dados clínicos de pacientes com câncer de próstata revelou que os genes ARCN1, CD55, CRIP2 e MFSD4A estão associados a um pior prognóstico, destacando-os como potenciais biomarcadores para monitoramento da progressão da doença. Esses achados reforçam a necessidade de estudos que avaliem os efeitos cumulativos de misturas de DEs em condições que simulem exposições ambientais reais. A compreensão desses impactos é essencial para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas voltadas à mitigação dos efeitos prejudiciais da exposição ambiental na saúde prostática, contribuindo para a redução dos riscos relacionados à progressão tumoral.

Palavras-chave: Desreguladores Endócrinos; Carcinogênese; Neoplasia Intraepitelial Prostática; Expressão Gênica

1. Introdução

A próstata, uma glândula acessória localizada próxima à uretra, desempenha um papel crucial no sistema reprodutor masculino. Estruturalmente, a próstata é composta por compartimentos glandulares circundados por estroma fibromuscular, ambos dependentes de estímulos hormonais (Williams et al., 1995). Os andrógenos, principalmente a testosterona (T), são fundamentais para o crescimento e a manutenção da próstata. O desenvolvimento prostático humano ocorre em três fases distintas: a primeira, estimulada pelos andrógenos, inicia-se durante a gestação e prolonga-se até a puberdade, com um aumento de T logo após o nascimento, essencial para a diferenciação dos compartimentos epitelial e estromal. A segunda fase acontece na puberdade, com um aumento significativo do volume da glândula, e a terceira ocorre na meia-idade, com crescimento focado na zona de transição, ao contrário das fases anteriores, nas quais a expansão abrange toda a glândula. Nesta última fase, observa-se um declínio gradual nos níveis séricos de T, que diminui aproximadamente 1% a 2% anualmente, tornando-se um aspecto relevante em estudos sobre a saúde prostática de homens de meia-idade e idosos (Cannarella et al., 2021).

Como revisado Welén & Damber (2022), condições como doenças prostáticas e redução dos níveis de andrógenos estão entre os problemas mais prevalentes no envelhecimento masculino. Evidências indicam que o avanço da idade está associado ao acúmulo de alterações gênicas e ao aumento da atividade progenitora das células prostáticas. Além disso, a idade contribui para um microambiente prostático pró-inflamatório, observando-se frequentemente em homens mais velhos modificações estruturais na próstata, como a remodelação da rede de colágeno e da vascularização. Essas características, embora não sejam causais do câncer, podem influenciar seu desenvolvimento e progressão, fazendo do envelhecimento um componente complexo e central na biologia do câncer de próstata (PCa).

As alterações neoplásicas na próstata progridem em várias etapas, incluindo a neoplasia intraepitelial prostática (PIN), o câncer localizado, o adenocarcinoma avançado e, eventualmente, o câncer metastático. Um aspecto fundamental do PCa é sua responsividade hormonal, inicialmente

observada por Huggins e Hodges (1941), que identificaram a regressão tumoral após a castração. Embora a terapia de privação de andrógeno (ADT) seja amplamente utilizada, a resistência a este tipo de terapia pode se desenvolver, resultando em câncer resistente à castração (CRPC) e variantes metastáticas (Chandrasekar et al., 2015).

Além dos fatores hormonais intrínsecos que regulam o desenvolvimento e progressão do PCa, a exposição a desreguladores endócrinos (DEs) é identificada como um fator ambiental potencialmente agravante. DEs podem mimetizar ou bloquear hormônios naturais, como os andrógenos, alterando a responsividade hormonal da próstata e, conseqüentemente, seu crescimento tumoral (Hafezi and Abdel-Rahman, 2019; Czarnywojtek et al., 2021). Evidências mostram que a exposição aos DEs contribui para o desenvolvimento do PCa. O estudo de Lam et al. (2016) demonstrou que a exposição prolongada ao bisfenol A (BPA) em ratos adultos leva ao aumento da proliferação celular, resposta inflamatória e formação de lesões pré-neoplásicas na próstata. Essa exposição, além de interagir com outros fatores oncogênicos, acelera a progressão do PCa no envelhecimento.

Embora existam evidências sobre os efeitos dos DEs na próstata, persistem lacunas importantes, especialmente em relação aos impactos de exposições prolongadas e a misturas complexas de DEs. A utilização de modelos experimentais com roedores é frequentemente justificada pelas semelhanças funcionais entre as próstatas humana e murina, particularmente na avaliação da interação hormonal e do desenvolvimento neoplásico. A próstata ventral de roedores é amplamente empregada devido à sua maior homologia com a zona periférica da próstata humana, o que permite uma extrapolação mais confiável dos resultados experimentais para o contexto humano (Ittmann, 2018). Assim, os modelos murinos representam uma ferramenta valiosa para investigar os efeitos cumulativos dos DEs no tecido prostático, considerando-se suas limitações e a necessidade de adaptações experimentais que favoreçam a validade translacional dos achados.

A próstata é um órgão hormônio-responsivo ao longo de toda a vida (Scarano et al., 2018), o que evidencia a importância de estudos de longa duração para entender os impactos cumulativos dos DEs no tecido prostático. No entanto, a maioria dos estudos utiliza exposições de curta duração e a DEs

isolados ou de grupos específicos, o que não reflete as condições ambientais reais, onde múltiplos DEs coexistem e interagem de forma complexa. Como exemplo, temos o estudo de Aquino et al. (2023) que relatou que a exposição a uma mistura de ftalatos durante o período gestacional e lactacional alterou o transcriptoma prostático de ratos, aumentando a suscetibilidade ao CaP. Na mesma linha de raciocínio, Wang et al. (2022) observaram que a exposição combinada ao BPA e seu análogo BPAF culminou com o surgimento de hiperplasia prostática em ratos adultos. Portanto, a exposição prolongada a uma variedade de DEs simula de maneira mais fidedigna as condições ambientais enfrentadas pelos seres vivos.

Diante desses desafios, protocolos experimentais que envolvam misturas de DEs ambientalmente relevantes e longos períodos de exposição são fundamentais para avanços científicos na área de toxicologia ambiental. Desta maneira, o presente estudo busca preencher essas lacunas ao investigar os efeitos de uma exposição prolongada a uma mistura de DEs, desde o período gestacional até a fase adulta, permitindo a avaliação das interações entre esses compostos e seus impactos nos processos moleculares e celulares essenciais à homeostase prostática.

Considerando os desafios da exposição contínua a uma mistura de DEs no microambiente prostático, nosso objetivo foi investigar as alterações histológicas e genômicas na próstata de ratos expostos, bem como o impacto desses DEs sobre a expressão gênica associada à sobrevivência e progressão tumoral. Dessa forma, esperamos avançar no entendimento dos mecanismos que sustentam a transformação neoplásica em órgãos hormônio-responsivos expostos a contaminantes ambientais, propondo novos biomarcadores para o monitoramento e estratégias de intervenção.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais e Ambiente de Experimentação

Foram utilizados 36 animais da linhagem *Sprague-Dawley* (SD), adquiridos no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica na Área de Ciências de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), sendo 24 fêmeas

adultas (120 dias de idade e peso aproximado de 300g) e 12 machos adultos (90 dias de idade e peso aproximado de 300g). Os animais foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste) e distribuídos para acasalamento na proporção de duas a três fêmeas para um macho por gaiola de polipropileno de 41x34x16cm, com tampa de aço inox em forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, com trocas duas vezes por semana. Durante todas as fases da experimentação, as condições ambientais do biotério foram controladas, sendo elas: temperatura (entre 23°C a 25°C), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), período de luz clara/escuro (12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão do ar contínua. Todos os animais receberam nutrição com ração comercial livre de fitoestrógenos (NUVILAB CR-1/Nuvital-PR) e água filtrada em bebedouros de vidro (capacidade de 500mL) com tampa e bico metálicos. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

Todos os procedimentos, incluindo administração de drogas, anestesia e eutanásia, foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unoeste, sob protocolo CEUA 6034 e seguiram as recomendações do *Animal Research Reporting of In Vivo Experiments — ARRIVE* (Kilkenny et al., 2010).

2.2 Mistura de Desreguladores Endócrinos (DE)

Foram utilizados 12 tipos diferentes de DEs. 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 presente mistura foi desenvolvida por Christiansen et al. (2012) e reproduzida por Axelstad et al. (2014), Isling (2014), Boberg et al. (2015) e Souza et al. (2023). No entanto, em nossa pesquisa, o paracetamol foi excluído devido ao seu potencial hepatotóxico (Tabela 1), seguindo assim a adaptação realizada por nosso grupo de pesquisa (Sousa et al., 2023).

A formulação utilizada no experimento foi ajustada para ser 100 vezes superior ao consumo humano estimado, com uma concentração final de 32,11 mg/kg/dia diluída em óleo de milho, que atuou como veículo. Esse aumento na dosagem baseia-se em métodos padrão para extrapolar doses seguras entre espécies, especificamente adaptando níveis de efeitos adversos não observados (NOAEL, do inglês *No Observed Adverse Effect Level*) obtidos em estudos com roedores para níveis seguros em humanos. Considera-se que o metabolismo dos ratos é substancialmente mais rápido, o que resulta em uma eliminação mais ágil dos compostos. Assim, a dose elevada compensa essa diferença, permitindo que os resultados reflitam melhor os efeitos de uma exposição contínua em humanos (ECHA, 2012). A administração foi realizada por via oral (gavagem) durante os períodos de gestação, lactação e na prole masculina até a idade adulta.

Tabela 1. Composição da mistura de Desreguladores Endócrinos para o consumo humano ajustado e mistura 100x utilizada em pesquisa.

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

^aChristiansen et al. (2012) informa detalhes sobre as estimativas do consumo humano e as concentrações ajustadas que foram escolhidas como base para a mistura

2.3 Delineamento Experimental

Após o período de acasalamento, a gestação das fêmeas foi confirmada pela citologia vaginal da fase de estro e pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, indicando o dia gestacional 0 (DG0). As fêmeas prenhes foram individualizadas nas gaiolas e randomizadas em 2 grupos experimentais

(n=10/grupo), sendo: grupo controle (CTRL) (veículo: óleo de milho, administrado por gavagem) e grupo EDMix (32,11 mg/kg/dia da mistura de DES diluída em óleo de milho (2 mL/Kg), administrado por gavagem).

As ratas prenhes e lactantes receberam a mistura do DG7 até o dia pós-natal 21 (DPN21), sempre no mesmo período, entre 8h e 10h. Todas as ratas foram pesadas em dias alternados para permitir o cálculo do volume de mistura de DES a ser administrado. No DPN1, foi mensurada a distância anogenital (DAG) da prole, diferenciando machos e fêmeas. O número de filhotes por ninhada foi reduzido para 8 filhotes, 4 fêmeas e 4 machos, sendo que ninhadas inferiores a 7 filhotes não foram utilizadas no estudo.

No DPN22 foi realizado o desmame dos filhotes machos, que foram separados em gaiolas com 3 animais cada, recebendo a mistura de DES diariamente até o DPN220, quando foram eutanasiados por injeção intramuscular de anestésicos, cetamina e xilazina, seguidos de exsanguinação. A próstata ventral (PV) foi coletada, pesada, encaminhada para análises histopatológicas, extração de RNA total seguida de sequenciamento e transcriptoma global (Figura 1).

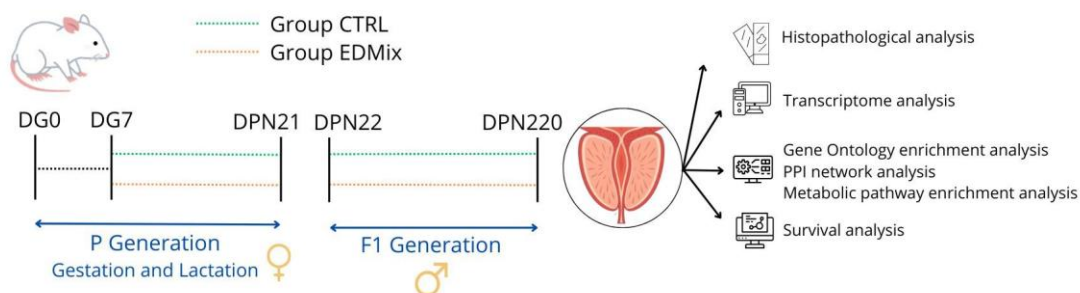


Figura 1. Delineamento experimental da exposição a uma mistura de desreguladores endócrinos (EDMix) durante a gestação e lactação em ratas prenhes (grupo EDMix) e controle (grupo CTRL). A exposição se inicia no dia 7 de gestação (DG7) e continua até o dia pós-natal 21 (DPN21). Após o desmame, os machos da prole F1 são monitorados até o dia pós-natal 220 (DPN220). Ao final do experimento, as próstatas são coletadas para análises de transcriptoma, enriquecimento de vias e rede de interação proteína-proteína (PPI), além de análise de sobrevida.

2.4 Análise Histopatológica

Os fragmentos da próstata ventral foram fixados rapidamente por imersão em metacarn (6 partes de metanol: 3 partes de clorofórmio: 1 parte de ácido acético) e armazenados em álcool 70%. Em seguida, o material foi desidratado em concentrações crescentes de etanol, clarificado em xilol e embebido em paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO, EUA). Os fragmentos embebidos em paraplast foram seccionados em espessuras de 4µm utilizando um micrótomo rotativo e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina (HE) para caracterização do microambiente tecidual. A avaliação foi feita às cegas por um observador experiente utilizando um microscópio óptico padrão (*Nikon Laboratories*, Tóquio, Japão).

2.5 Isolamento do RNA Total

Dez fragmentos da próstata ventral (n=5/grupo) foram submetidos à extração de RNA total. A extração foi realizada com Trizol® (*ThermoFisher Scientific*), seguindo as instruções do fabricante. Foram mensuradas as concentrações de RNA total (Qubit®, *ThermoFisher*), pureza da amostra (Nanodrop, ND2000®) e a integridade do RNA (Agilent 2100, Bioanalyzer), sendo que apenas as amostras com RIN (*RNA Integrity Number*) acima de oito (escala de 0 a 10) foram utilizadas para as análises. O RNA total (1µg) de cada amostra foi incubado com DNase I (Invitrogen®).

2.6 Preparação de Bibliotecas de Sequenciamento

A preparação das bibliotecas de sequenciamento de nova geração foi realizada por meio de serviços fornecidos pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida – LACTAD. A construção das bibliotecas de mRNA utilizou o kit TruSeq RNA Sample Prep® (Illumina, San Diego, EUA), seguindo rigorosamente as especificações do protocolo fornecido. A remoção de RNA ribossomal foi efetuada através de microesferas magnéticas acopladas a oligonucleotídeos específicos. As bibliotecas resultantes foram purificadas e amplificadas (200pb ±30 pb) via reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando primers específicos para

adaptadores da Illumina. A qualidade das bibliotecas foi então avaliada pelo Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies), usando um chip DNA 1000, com amostras de boa qualidade apresentando fragmentos em torno de 260 pb. O sequenciamento foi executado no equipamento HiSeq-2500 (Illumina, San Diego, EUA) usando o protocolo de *pair-end reads* e o kit TruSeq PE.

2.7 Controle de Qualidade e Análise de Expressão diferencial

O controle de qualidade e a filtragem das leituras brutas foram realizados com o software FastQC (Andrews, 2010), onde somente leituras com pontuação Phred ≥ 28 foram mantidas. Leituras redundantes foram eliminadas usando o Trimomatic para otimizar o uso de recursos computacionais. As leituras finais foram então mapeadas contra o genoma de referência usando HISAT2 (Kim et al., 2015) e quantificadas com HTSeq (Anders et al., 2015). Utilizou-se o algoritmo DESeq2 (Love et al., 2014) do pacote Bioconductor em R para estimar as diferenças na expressão gênica entre os genótipos. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles com $\log_2$ Fold Change $\geq |1,5|$ e valor p ajustado ≤ 0.05 . A representação gráfica dos dados foi feita com o programa heatmap.2 para R, organizando os *contigs* normalizados em grupos definidos através da análise de dendrograma e correlação de Pearson.

2.8 Análise de Ontologia Gênica (GO)

A análise de enriquecimento de termos *Gene Ontology* (GO) foi conduzida utilizando o pacote *clusterProfiler* no ambiente de software R, com o objetivo de explorar as funções biológicas, moleculares e celulares associadas aos genes diferencialmente expressos (DEGs). Foram avaliadas as três principais categorias da ontologia gênica: *Biological Process* (BP), que abrange os processos biológicos em que os genes estão envolvidos; *Molecular Function* (MF), que descreve as funções moleculares desempenhadas pelos produtos gênicos; e *Cellular Component* (CC), que identifica as localizações celulares onde os produtos gênicos atuam. O critério de significância foi valor de p ajustado $< 0,05$, com correção para múltiplos testes pelo método de Benjamini-Hochberg. Além disso, para facilitar a interpretação e comunicação dos

resultados, foram identificados e filtrados termos *GO Slim* por meio do pacote *GOSemSim*, permitindo uma interpretação direta dos resultados.

2.9 Análise de Enriquecimento de Vias Metabólicas

A análise de enriquecimento de vias foi conduzida utilizando o pacote *ReactomePA* no ambiente R, com base no banco de dados *Reactome*, que fornece uma ampla coleção de vias metabólicas e de sinalização. Os DEGs foram mapeados para as vias disponíveis, incluindo aquelas relacionadas a metabolismo, sinalização celular, ciclo celular e resposta ao estresse. Para garantir a robustez dos resultados, foi aplicado um critério de significância com p ajustado $< 0,05$. As vias significativamente enriquecidas foram organizadas e classificadas com base na sua relevância funcional e biológica, destacando aquelas mais impactadas, a fim de fornecer uma visão abrangente dos processos biológicos potencialmente modulados no contexto experimental.

2.10 Análise de Sobrevida

Para investigar o impacto de genes diferencialmente expressos na sobrevida de pacientes com câncer de próstata, conduzimos uma análise de sobrevida utilizando dados disponíveis publicamente através do cBioPortal for Cancer Genomics (Zheng et al., 2020). Os dados utilizados provêm de pacientes humanos diagnosticados com câncer de próstata, uma vez que não há um banco de dados equivalente para roedores. Esses dados abrangem registros completos de expressão gênica e acompanhamento clínico, possibilitando uma comparação direta com as alterações observadas em nosso estudo experimental com ratos, apesar das limitações de extrapolação interespecies. Utilizamos dados de RNA-seq do The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) para dividir os pacientes em dois grupos: um com alterações gênicas e outro sem alterações (referido como grupo inalterado).

As alterações gênicas identificadas nos pacientes com câncer de próstata foram amplas, podendo incluir diferentes tipos de modificação, como mutações, variações na expressão ou outras alterações não especificadas que refletem uma instabilidade genômica típica do microambiente tumoral. Esse cenário de alterações gênicas complexas, presente também em nosso modelo

experimental, sugere que o comportamento gênico observado na exposição prolongada a DEs pode apresentar paralelos clínicos significativos.

A comparação entre os grupos foi realizada com ênfase no grupo alterado e em um subgrupo que expressava especificamente os genes de interesse. A análise das curvas de sobrevida foi feita por meio do teste de log-rank, que avalia a hipótese nula de não existência de diferenças significativas na probabilidade de eventos adversos (como morte ou progressão da doença) entre os grupos em qualquer intervalo de tempo estudado. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier (Dudley et al., 2016) foram elaboradas para ilustrar visualmente as discrepâncias na sobrevivência entre os grupos comparados.

A Razão de Risco (RR) do inglês, *Hazard Ratio*, calculado a partir desta análise, serve para quantificar o risco relativo associado aos diferentes níveis de expressão gênica. Um RR superior a 1 sugere um aumento no risco relacionado à alta expressão do gene, indicativo de um prognóstico desfavorável. Por outro lado, um RR inferior a 1 implica um efeito protetor associado à expressão elevada, o que pode indicar um prognóstico mais favorável para esses pacientes

2.11 Validação dos dados

A validação dos dados obtidos a partir da análise transcricional foi realizada utilizando o banco de dados *Human Protein Atlas* (HPA). Esse banco de dados foi selecionado para investigar a expressão dos genes modulados pela exposição precoce a uma mistura de DEs em amostras de adenocarcinoma de próstata humano. Os genes alvo selecionados, incluindo *ARCN1*, *CD55*, *CRIP2* e *MFSD4*, foram analisados através de fotomicrografias obtidas no HPA, as quais apresentam resultados de marcação imuno-histoquímica (IHC) dos produtos desses genes em tecidos prostáticos. A expressão proteica foi avaliada considerando-se a intensidade da marcação e a extensão da área marcada.

3. Resultados

3.1 Caracterização histopatológica

A avaliação histopatológica evidenciou nos animais do grupo CTRL ácinos prostáticos dilatados apresentando epitélio cúbico simples e raros focos inflamatórios no estroma. Entretanto, a mistura de DEs alterou a histoarquitetura glandular, com a presença de áreas com neoplasia intraepitelial prostática de baixo grau (LGPIN) em 80% dos animais, como demonstrado em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (Sousa et al., 2023) (Figura 2C, D e G). As áreas de LGPIN foram caracterizadas pela perda da polaridade celular (Figura 2H) e núcleos com nucléolos evidentes (Figura 2E). Além disso, nos animais expostos à mistura de DEs foram observados focos inflamatórios tanto no estroma prostático quanto no lúmen dos ácinos (Figura 2F e G).

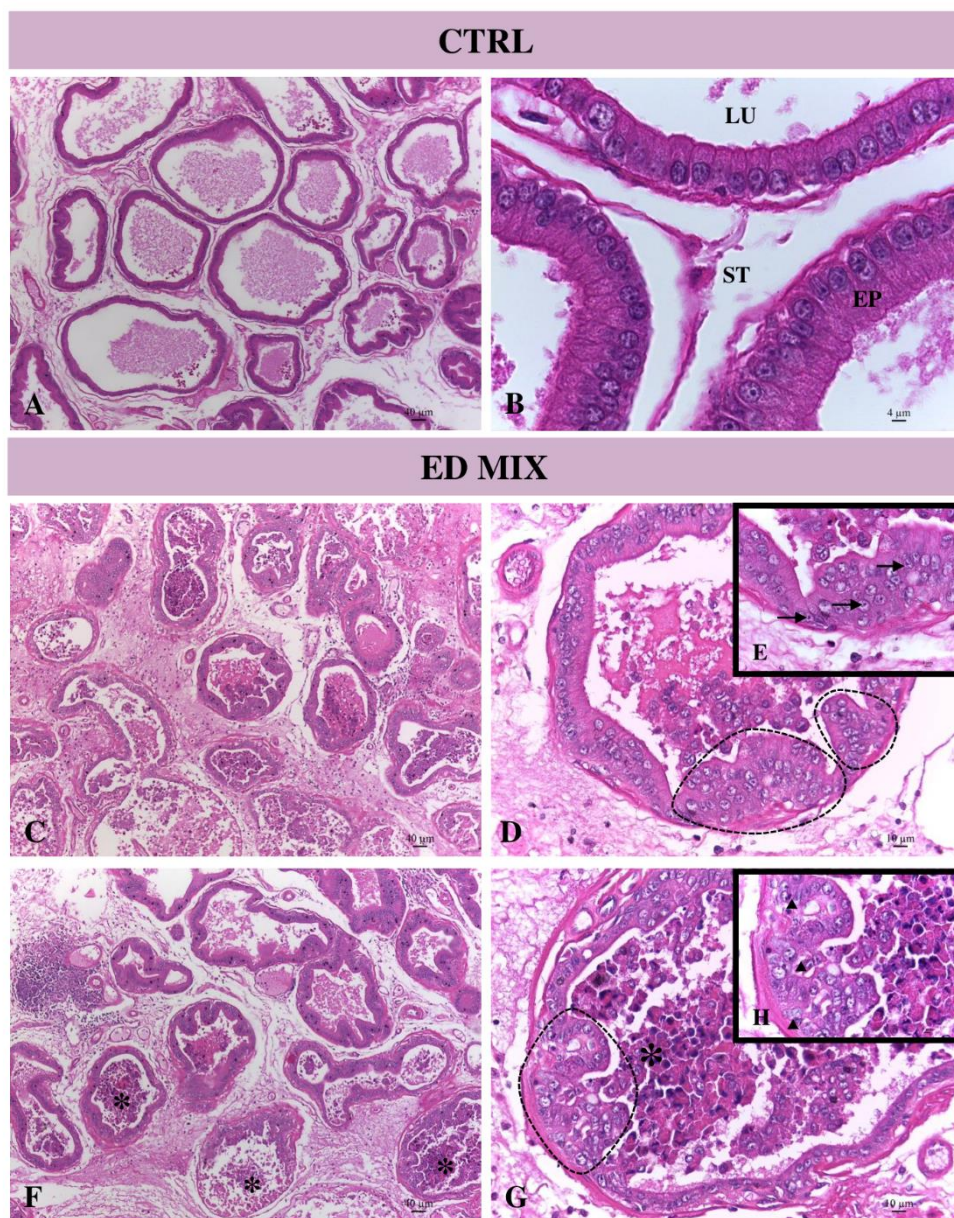


Figura 2. Efeitos da exposição a uma mistura de desreguladores endócrinos (DEs) na histoarquitetura prostática. (A-B) CTRL apresentando ácinos prostáticos com epitélio cúbico simples (EP), sem alterações significativas na morfologia glandular e ausência de inflamação evidente no estroma prostático (ST). (C-G) EDMix, evidenciando perda da morfologia prostática típica (C), com a presença de ácinos com LGPIN (círculo tracejado, D e G) e núcleos com núcleo evidente (setas, E) e perda de polaridade celular (cabeça de seta, H). Além disso foram encontrados presença de foco inflamatórios no tanto no estroma como no interior dos ácinos prostáticos (asterisco, F). Coloração por HE. Barras: 40µm (A, C e F), 10µm (D e G), 4µm (B, E e H).

3.2 Triagem dos Genes Diferencialmente Expressos (DEGs)

A análise de expressão gênica revelou um total de 906 genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os grupos CTRL e EDMix. Utilizando os critérios de $\text{Log}_2 \text{Fold-Change} \geq |1,5|$ e $p\text{-valor} \leq 0,05$, foram identificados 48 DEGs com significância estatística. Desses, 3 genes apresentaram regulação positiva, com maior expressão no grupo CTRL em comparação ao EDMix, enquanto 45 genes mostraram regulação negativa, com expressão reduzida no grupo CTRL em relação ao EDMix, indicando superexpressão desses genes no grupo EDMix (Figura 3, Tabela 2).

A análise do Heatmap (Figura 3B) evidenciou padrões distintos de expressão gênica. Esses achados fornecem uma base sólida para a compreensão das alterações na expressão gênica provocadas pela exposição de ratos machos à mistura de DEs desde a vida intratuterina até a fase adulta, delineando um perfil diferencial significativo entre os grupos analisados.

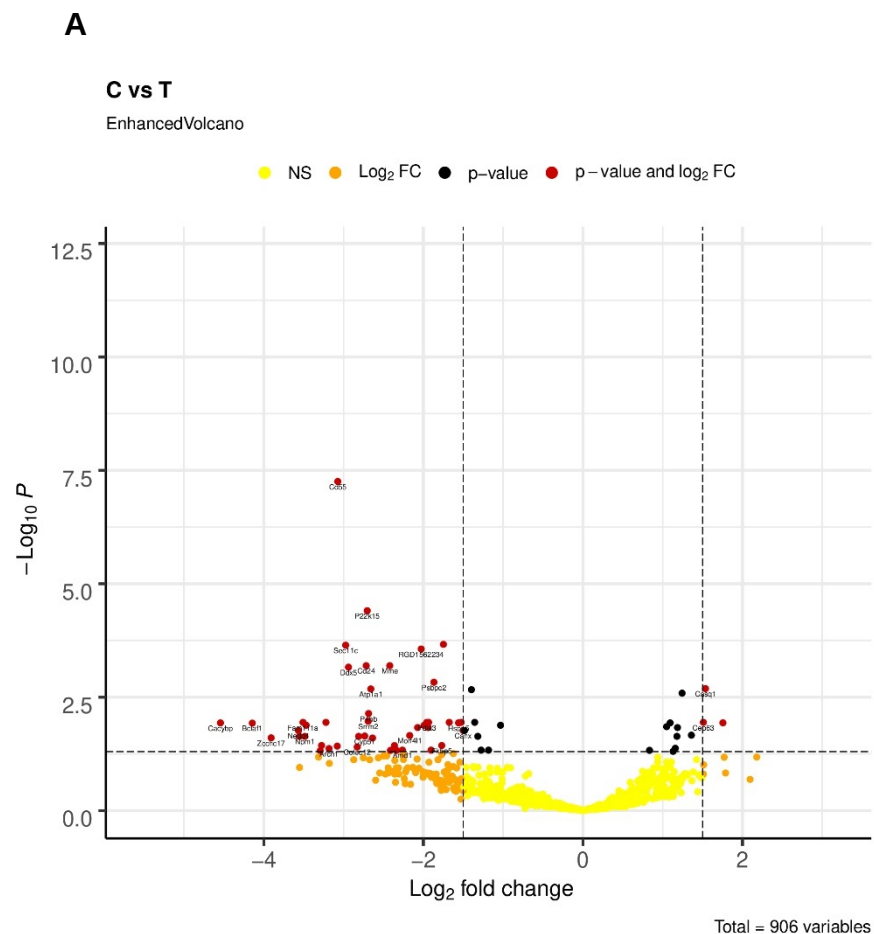


Figura 3. Análise de expressão gênica para os grupos CTRL e EDMix. A) Volcano plot DEG, onde p-valor $\leq 0,05$ é considerado significativo e representa no eixo vertical como $-\text{Log}_{10}P$ sendo 1,3. Genes com Log_2 fold-change $\geq |1,5|$ destacado por linhas pontilhadas verticais. Círculos vermelhos correspondem DEG significativos. B) Heatmap para DEGs entre os grupos CTRL e EDMix. As linhas definem genes enquanto as colunas representam animais, ambas organizadas em clusters que mostram padrões de expressão únicos entre os grupos.

Tabela 2. Dados estatísticos dos genes diferencialmente expressos entre CTRL e EDMix.

Genes	Log₂FoldChange	pvalue	Genes up or downregulated in CTRL compared to EDMix
<i>Cacybp</i>	-4,54374017	0,00034566	Down
<i>Bclaf1</i>	-4,14398436	0,00036373	Down
<i>Zcchc17</i>	-3,90818957	0,00129025	Down
<i>Nedd4</i>	-3,56486981	0,00071908	Down
<i>Prpf4b</i>	-3,55434419	0,00117234	Down
<i>Fam111a</i>	-3,50868864	0,0002048	Down
<i>Npm1</i>	-3,4852988	0,00116623	Down
<i>Vcp</i>	-3,46844726	0,00044642	Down
<i>Nars</i>	-3,29214422	0,00331997	Down
<i>Prpf40a</i>	-3,27585724	0,00202324	Down
<i>Nr3c2</i>	-3,22110073	0,00028338	Down
<i>Arcn1</i>	-3,18226462	0,00260027	Down
<i>Stx19</i>	-3,07970386	0,00217326	Down
<i>Cd55</i>	-3,07295637	6,1281E-11	Down
<i>Sec11c</i>	-2,97372778	9,9733E-07	Down
<i>Ddx5</i>	-2,93795507	6,0838E-06	Down
<i>Colec12</i>	-2,82884482	0,00231246	Down
<i>Mat2a</i>	-2,81124665	0,00111271	Down
<i>Cyp51</i>	-2,73494724	0,0010277	Down
<i>Cd24</i>	-2,71664815	4,88E-06	Down
<i>P22k15</i>	-2,7036768	8,6496E-08	Down
<i>Srrm2</i>	-2,6917416	0,0001777	Down
<i>P4hb</i>	-2,68659698	0,00011175	Down
<i>Atp1a1</i>	-2,65871475	2,5256E-05	Down
<i>Serbp1</i>	-2,63725127	0,00133081	Down
<i>Mme</i>	-2,42074307	4,9292E-06	Down
<i>Srsf5</i>	-2,41228974	0,00320014	Down
<i>Spats1</i>	-2,36245987	0,00207379	Down
<i>Cdh1</i>	-2,33676648	0,00321372	Down
<i>Amd1</i>	-2,26171904	0,0030183	Down
<i>Morf4l1</i>	-2,17118369	0,00097537	Down
<i>Rpl5</i>	-2,07271485	0,00055306	Down
<i>RGD1562234</i>	-2,02719556	1,5099E-06	Down
<i>Ywhae</i>	-1,98989986	0,00044883	Down
<i>Pdia3</i>	-1,9570158	0,00024545	Down
<i>Tpt1</i>	-1,93973033	0,00056238	Down
<i>Tpm1</i>	-1,93471273	0,0002866	Down
<i>Top1</i>	-1,90321669	0,00293472	Down
<i>Psbpc2</i>	-1,86747732	1,4667E-05	Down
<i>Fkbp5</i>	-1,76956725	0,0020154	Down
<i>S100vp</i>	-1,74822217	7,1652E-07	Down
<i>Mfsd4</i>	-1,67590144	0,00026689	Down
<i>Hspa5</i>	-1,55841736	0,00031996	Down
<i>Scgb1d2</i>	-1,5262489	0,00028736	Down
<i>Canx</i>	-1,50228036	0,00068003	Down
<i>Cep63</i>	1,50946003	0,00024997	Up
<i>Casq1</i>	1,53588351	2,2542E-05	Up
<i>Morn5</i>	1,75439578	0,00032016	Up

3.3 Enriquecimento em Ontologia Gênica (GO)

Os termos GO enriquecidos evidenciam processos biológicos críticos, relacionados à regulação da expressão gênica e à manutenção da homeostase celular. Entre os termos mais representativos os relacionados ao *splicing* de RNA apresentaram enriquecimento robusto, evidenciado por processos como "*RNA splicing, via transesterification reactions*" (GO:0000375) e "*RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile*" (GO:0000377). Esses termos destacam reações de *splicing* que utilizam transesterificação para a excisão de íntrons e união de exons. Esse mecanismo é fundamental para a geração de transcritos funcionais, garantindo a diversidade proteica. O termo "*mRNA splicing, via spliceosome*" (GO:0000398) complementa essa observação, reforçando o papel crítico do spliceossomo na excisão precisa de íntrons, resultando em mRNAs maduros prontos para tradução. Por fim, outro processo destacado foi o "*protein folding*" (GO:0006457), que envolve a assistência na montagem covalente e não covalente de polipeptídeos na sua estrutura terciária correta. Esse processo é vital para a funcionalidade proteica, garantindo que as proteínas recém-sintetizadas alcancem suas conformações nativas, evitando agregações e promovendo a homeostase proteica. Os resultados evidenciam a inter-relação entre processos nucleares e citoplasmáticos, essenciais para a manutenção da funcionalidade celular. Os DEGs envolvidos, como *Ddx5*, *Nedd4*, *P4hb*, *Prpf4b*, entre outros, aparecem em múltiplos termos, destacando-se como elementos centrais nesses processos (Tabela 3, Figura 4).

Tabela 3. Enriquecimento de Ontologia Gênica com base nos termos de Gene Ontology (GO).

<i>ID GO</i>	<i>Description</i>	<i>Fold Enrichment</i>	<i>p value adjust</i>	<i>Genes</i>
GO:2000563	Positive regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell proliferation	73,64	0,000326	<i>Cd55</i> and <i>Cd24</i>
GO:0034976	Response to endoplasmic reticulum stress	8,96	0,032036	<i>P4hb</i> , <i>Pdia3</i> , <i>Hspa5</i> , <i>Vcp</i> and <i>Canx</i>
GO:0016485	Protein processing	9,65	0,028897	<i>Sec11c</i> , <i>Mme</i> , <i>P4hb</i> , <i>Fam111a</i> and <i>Cdh1</i>
GO:0006457	Protein folding	12,46	0,011128	<i>P4hb</i> , <i>Pdia3</i> , <i>Hspa5</i> , <i>Canx</i> and <i>Fkbp5</i>
GO:0000377	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	9,76	0,010065	<i>Ddx5</i> , <i>Srrm2</i> , <i>Prpf4b</i> , <i>Npm1</i> , <i>Prpf40a</i> and <i>Srsf5</i>
GO:0000375	RNA splicing, via transesterification reactions	9,74	0,010065	<i>Ddx5</i> , <i>Srrm2</i> , <i>Prpf4b</i> , <i>Npm1</i> , <i>Prpf40a</i> and <i>Srsf5</i>
GO:0008380	RNA splicing	7,09	0,028897	<i>Ddx5</i> , <i>Srrm2</i> , <i>Prpf4b</i> , <i>Npm1</i> , <i>Prpf40a</i> and <i>Srsf5</i>
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	9,74	0,010065	<i>Ddx5</i> , <i>Srrm2</i> , <i>Prpf4b</i> , <i>Npm1</i> , <i>Prpf40a</i> and <i>Srsf5</i>
GO:0006397	mRNA processing	6,43	0,038429	<i>Ddx5</i> , <i>Srrm2</i> , <i>Prpf4b</i> , <i>Npm1</i> , <i>Prpf40a</i> and <i>Srsf5</i>

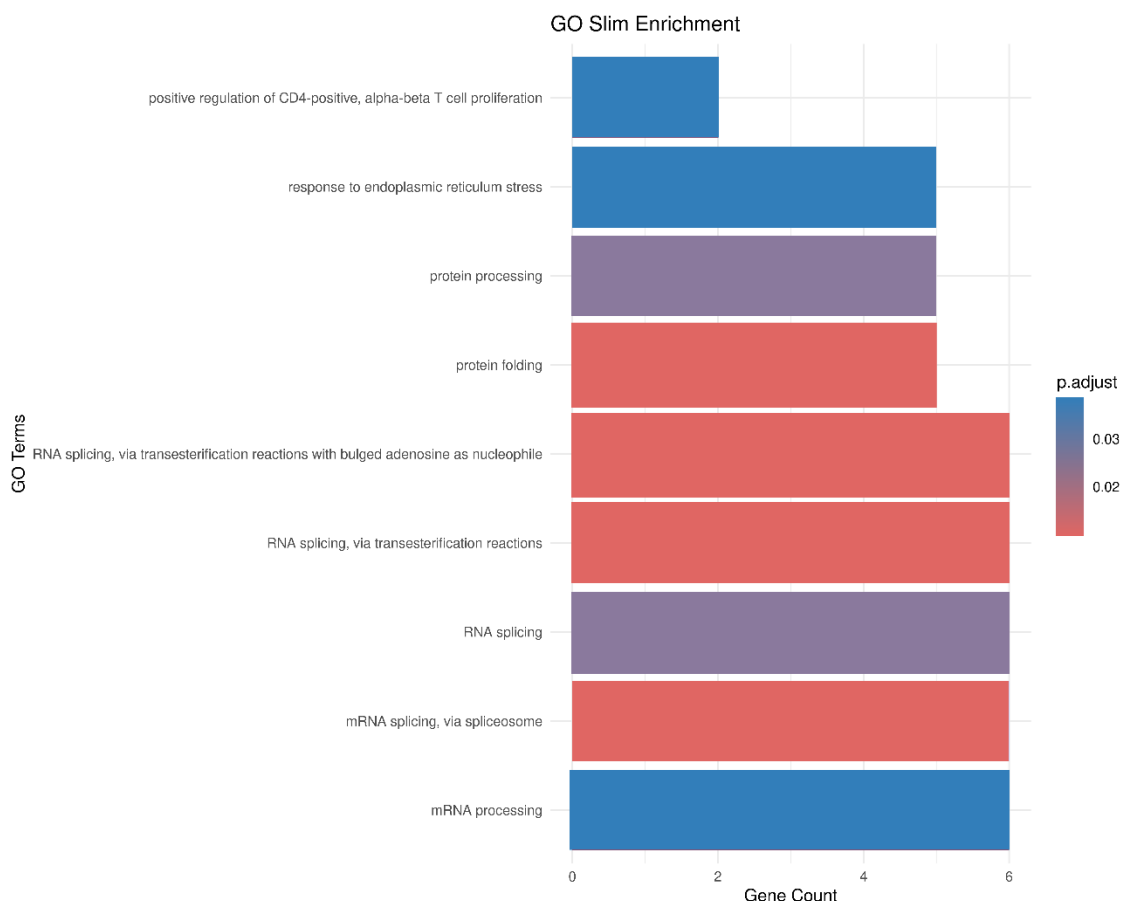


Figura 4. Enriquecimento funcional de termos Gene Ontology (GO) associados aos DEGs. O gráfico apresenta os principais termos GO enriquecidos nas categorias de processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares.

3.4 Enriquecimento de vias metabólicas

A análise de enriquecimento de vias metabólicas indicou associações significativas entre os DEGs e processos fundamentais para a adaptação celular, com ênfase nas vias *Cellular responses to stress* e *Cellular responses to stimuli*. Essas vias representam mecanismos de resposta celular a estresses moleculares e físicos, como estímulos ambientais e metabólicos, que impactam diretamente na homeostase celular. Além dessas vias principais, foram também enriquecidas vias como *N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle*, um processo essencial no dobramento de proteínas mediado por N-glicanos, que garante o controle de qualidade proteico no retículo endoplasmático (RE), *Antigen Presentation: folding, assembly and peptide loading of class I MHC*, um processo vital na imunidade adaptativa por

meio do carregamento de peptídeos no MHC classe I, e *Peptide hormone metabolism*, que abrange o processamento e regulação de hormônios peptídicos. Ainda, *Interleukin-12 family signaling* foi identificada, envolvendo a sinalização de interleucinas e a ativação de vias imunológicas, desempenhando papel na resposta imune celular. Essas vias, embora menos significativas em termos de valor de p ajustado, indicam uma possível interconexão funcional com as principais respostas ao estresse e estímulos. Essa coordenação sugere uma complexa rede de adaptação celular envolvendo o controle de qualidade proteica, imunidade e sinalização, todos modulados para garantir a homeostase e a sobrevivência em condições dinâmicas (Figura 5).

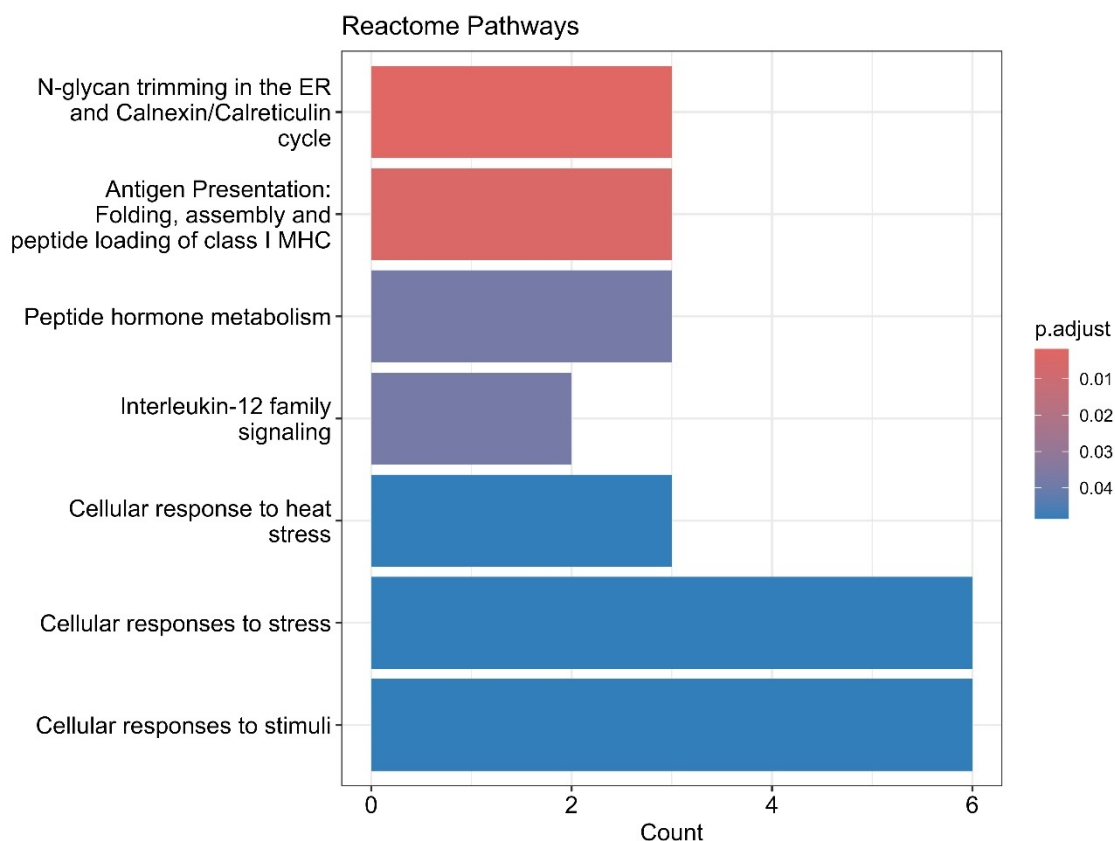


Figura 5. Enriquecimento de vias metabólicas e de sinalização celular associadas aos DEGs. O gráfico apresenta as principais vias enriquecidas identificadas pela análise, ordenadas de acordo com sua significância estatística (p ajustado). As barras representam o grau de enriquecimento das vias.

3.5 Análise de Sobrevida

A análise de sobrevida revelou que quatro genes apresentaram diferenças significativas na sobrevivência dos pacientes do grupo alterado em comparação ao grupo inalterado (Tabela 4). Os genes identificados foram *ARC11*, *CD55*, *CRIP2* e *MSFD4A*, cujas expressões foram correlacionadas com o tempo de sobrevida, sugerindo que alterações nesses genes podem impactar a progressão da doença tanto em humanos quanto em modelos animais.

No modelo animal deste estudo, observamos uma superexpressão desses genes em ratos EDMix. Quando comparados aos dados humanos, verificou-se que esses mesmos genes estavam relacionados com uma menor sobrevida dos pacientes. Essa relação sugere que os mecanismos moleculares observados nos ratos podem ser extrapolados para o contexto humano,

indicando um possível papel crítico desses genes na progressão da doença. No entanto, é importante ressaltar que as alterações nos pacientes humanos incluíram diversas modificações gênicas, como mutações, que podem contribuir para um prognóstico desfavorável. Dessa forma, os resultados obtidos em ratos fornecem informações importantes, mas há limitações quanto à aplicação direta dos achados para a fisiopatologia humana, dado que outros fatores genéticos e ambientais podem impactar nesses desfechos.

O gene *ARCN1* (*Archain 1*), envolvido no transporte vesicular e na manutenção da integridade do complexo de Golgi, apresentou relação com a redução significativa da sobrevivência dos pacientes (Figuras 6A). Além disso, tecidos provenientes de adenocarcinoma prostático apresentaram forte imunorreatividade para a proteína, corroborando seu papel relevante nos desfechos clínicos (Figura 7A). De forma semelhante, *CD55* (*Decay-Accelerating Factor*), responsável pela regulação da ativação do complemento, foi associado a um pior prognóstico no câncer de próstata (Figuras 6B). No entanto, a imunorreatividade para esta proteína foi mais fraca, sugerindo uma possível regulação específica no microambiente prostático (Figura 7B).

O *CRIP2* (*Cysteine-rich protein 2*), conhecido por sua participação na regulação da transcrição e na modulação da resposta inflamatória, também está relacionado com sobrevivência reduzida (Figura 6C). A proteína exibiu uma forte marcação tecidual, destacando sua relevância nos processos de agressividade tumoral e resposta inflamatória (Figura 7C). Finalmente, *MSFD4A* (*Major Facilitator Superfamily Domain Containing 4A*), que desempenha um papel no transporte transmembranar, foi associado a desfechos desfavoráveis, com menor sobrevivência (Figura 6D). Sua imunomarcação moderada sugere uma expressão intermediária que pode estar relacionada a mecanismos específicos no desenvolvimento tumoral (Figura 7D).

Tabela 4. Análise de sobrevida do grupo alterado em comparação ao grupo inalterado.

<i>Genes</i>	<i>pvalue</i>
<i>ARCN1</i>	0,0575
<i>CD55</i>	0,0321
<i>CRIP2</i>	0,009139
<i>MFSD4A</i>	0,0002802

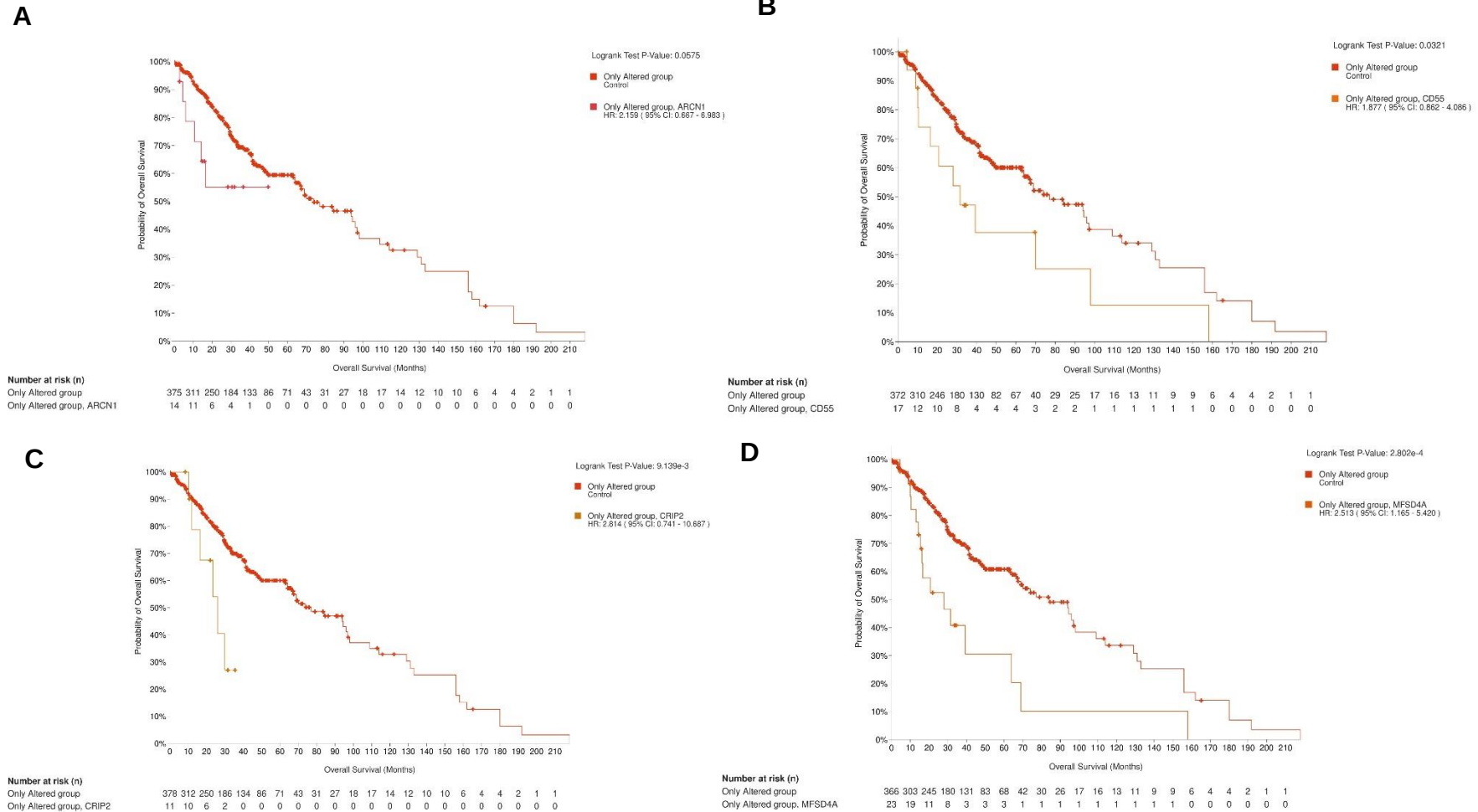


Figura 6. Gráficos de Kaplan-Meier da análise de sobrevivência dos DEGs *ARC11*, *CD55*, *CRIP2* e *MSFD4A*. A linha vermelha representa o grupo com alteração dos genes (*Only Altered Group*), enquanto a linha laranja representa o DEG. (A) Sobrevivência animal em relação à expressão de *ARC11*, (B) *CD55*, (C) *CRIP2* e (D) *MSFD4A* conhecidas e previstas.

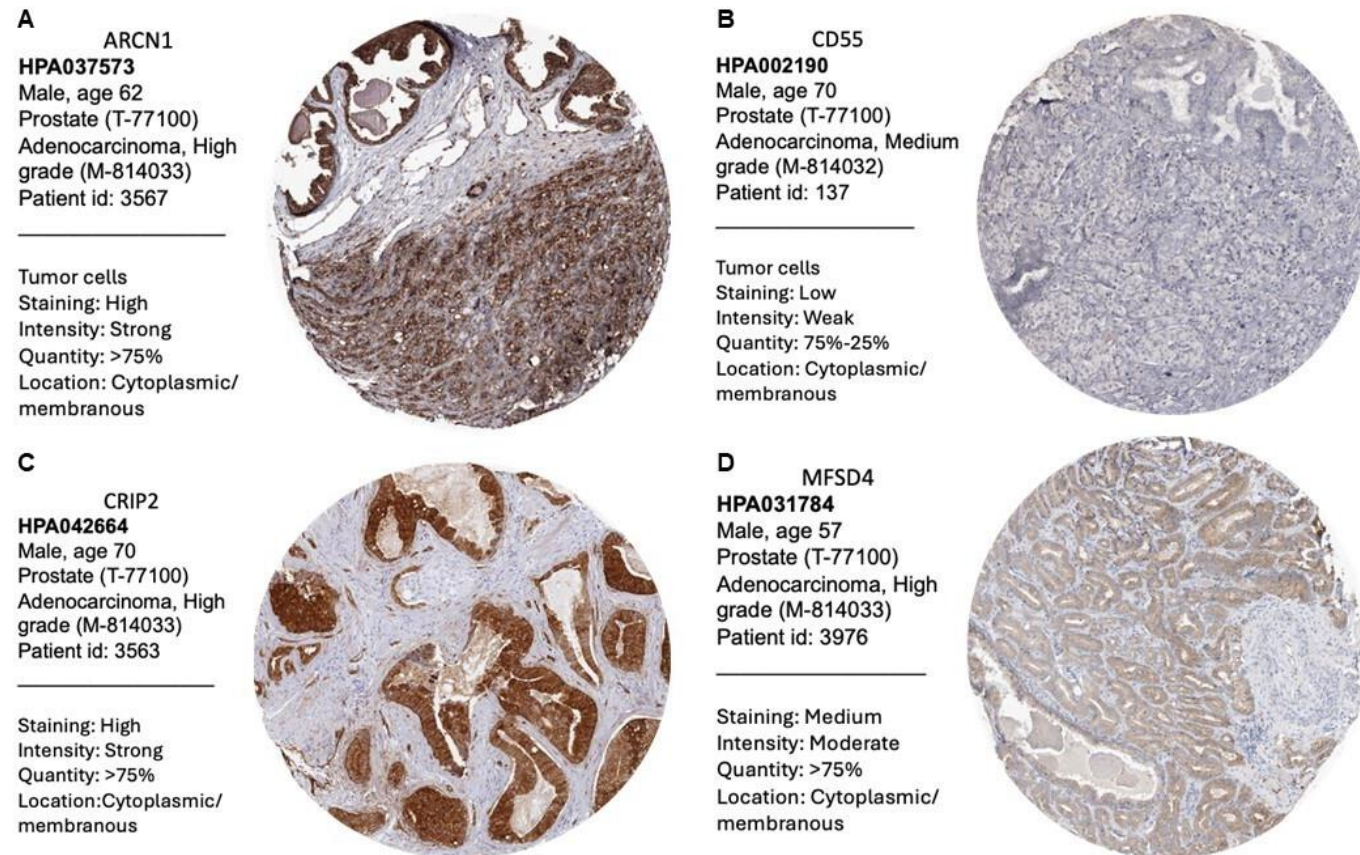


Figura 7. Pranchas histológicas mostrando reação positiva, através de imuno-histoquímica, para sete proteínas ARC1, CD55, CRIP2 e MFSD4 em amostras de adenocarcinoma de próstata humano. Secções histológicas representativas e informações de pacientes evidenciaram reações positivas para as proteínas ARC1 (A), CD55 (B), CRIP2 (C) e MFSD4A (D) em adenocarcinoma de próstata de homens com idades entre 57 e 70 anos. As imagens foram obtidas utilizando a ferramenta do banco de dados *Human Protein Atlas* (HPA).

4. Discussão

Este estudo avaliou os efeitos da exposição prolongada a uma mistura de DEs no microambiente prostático de ratos, revelando alterações tanto na histoarquitetura tecidual quanto no perfil transcricional. Os resultados confirmam a hipótese de que a exposição contínua a DEs durante diferentes estágios da vida promove o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, além de impactar na homeostase celular. Os achados moleculares evidenciam a complexidade da regulação celular em resposta à exposição prolongada de DEs. A análise de enriquecimento em ontologia gênica apontou processos cruciais para a funcionalidade celular, destacando uma complexa rede de mecanismos de adaptação que suportam tanto as atividades nucleares quanto citoplasmáticas. Esse conjunto de processos evidencia a capacidade adaptativa celular em modular a transcrição, o processamento e o transporte de RNAs, aspectos fundamentais para a resposta eficaz a estressores ambientais. Por fim, a análise de sobrevivência revelou que os genes *ARCN1*, *CD55*, *CRIP2* e *MSFD4A* apresentaram diferenças significativas na sobrevivência dos pacientes com câncer de próstata.

Os resultados revelam uma forte interconexão entre processos nucleares e citoplasmáticos, destacando a importância do transporte entre núcleo e citoplasma e do *splicing* de RNA na regulação gênica e na manutenção da homeostase celular. O gene *DDX5* codifica a proteína p68, uma RNA helicase multifuncional envolvida em diversos aspectos da expressão gênica, incluindo o *splicing* alternativo e o processamento de RNA. Esta proteína desempenha um papel crucial na biogênese de miRNAs, no controle da tradução e no processamento de transcritos específicos, impactando diretamente na regulação da expressão gênica em diferentes contextos celulares (Xing et al., 2019). No câncer de próstata, a p68 atua como co-ativadora do receptor de andrógeno (AR), facilitando a transcrição de genes dependentes de AR, o que está associado à progressão da carcinogênese prostática (Nyamao et al., 2019). Esse papel da p68 torna-se ainda mais relevante em contextos de exposição a DEs, que afetam a sinalização hormonal e podem exacerbar a ativação do AR, contribuindo para o desenvolvimento de lesões prostáticas pré-neoplásicas. Além disso, o *DDX5* está frequentemente superexpresso em diversas malignidades humanas, contribuindo para a translocação de fatores como β -catenina e sua interação com receptores hormonais, reforçando seu papel na transição epitélio-

mesenquimal (EMT), proliferação e metástase. Evidências levantadas por Scarano et al. (2018) sugerem que os DEs afetam as junções celulares da próstata, controladas por hormônios, especialmente durante fases críticas do desenvolvimento prostático. Entre os principais efeitos observados estão a redução da E-caderina e o aumento de vimentina, ambos associados à EMT, que desestabilizam o epitélio e favorecem a formação de lesões pré-neoplásicas. Em nosso estudo, observamos que a exposição a uma mistura de DEs induziu alterações prostáticas significativas, incluindo a presença de lesões pré-neoplásicas, como PIN.

A adaptação celular também é sustentada por mecanismos de controle de qualidade proteica, como evidenciado pela via *n-glycan trimming in the ER and calnexin/calreticulin cycle*, relacionadas ao dobramento e processamento de proteínas no RE. Esses processos são fundamentais para a prevenção de agregados proteicos que, em situações de estresse, poderiam comprometer a funcionalidade celular. Nesse contexto, o gene *CANX*, que codifica a calnexina, auxilia no dobramento correto de glicoproteínas recém-sintetizadas no RE. No câncer de próstata, sua superexpressão está associada à progressão tumoral, sugerindo um papel na manutenção da estabilidade proteica em células malignas sob estresse celular (Luo et al., 2024). Além disso, o gene *P4HB* codifica a subunidade *beta da prolyl 4-hidroxilase*, uma chaperona do RE crucial no dobramento proteico e na manutenção da homeostase. Este gene está altamente expresso em tecidos de câncer de próstata e se correlaciona com resistência à radioterapia e pior prognóstico. A regulação negativa de *P4HB* inibe a proliferação celular em diversas linhagens de células de câncer de próstata, reforçando seu papel oncogênico (Feng et al., 2023). Por fim, o *HSPA5*, que codifica a chaperona GRP78, também desempenha papel central no estresse do RE, auxiliando na regulação de proteínas pró e anti-apoptóticas. Sua superexpressão em condições tumorais está associada à proliferação celular e à EMT, facilitando a adaptação das células cancerígenas às condições adversas do microambiente tumoral (Fu et al., 2022).

Os dados apontam para uma interação funcional entre os mecanismos de resposta ao estresse e a ativação de vias imunológicas. A sinalização de interleucinas e a apresentação antigênica indicam que a célula não apenas ajusta processos internos para lidar com o estresse provocado pelo ambiente, mas também

se prepara para responder a ameaças externas, ativando respostas imunes adaptativas. Nesse contexto, o gene *CD55* desempenha um papel crucial ao inibir a cascata do complemento, protegendo as células tumorais contra a lise mediada pelo sistema imune. No câncer de próstata, a expressão aumentada de *CD55* está associada à progressão de lesões PIN até estágios mais avançados, incluindo câncer metastático (Loberg et al., 2005). Esses dados sugerem que o *CD55* contribui não apenas para a evasão imunológica, mas também para a adesão celular e o potencial invasivo, reforçando sua importância na progressão tumoral e na formação de um microambiente favorável ao desenvolvimento do câncer.

Na análise de sobrevida, o gene *ARCN1* codifica a subunidade delta do complexo COPI, essencial para o transporte intracelular de vesículas. Essa atividade é essencial para a manutenção da homeostase celular e para a reciclagem de proteínas e lipídios. A superexpressão de *ARCN1* foi associada a um prognóstico desfavorável em alguns tipos de câncer, como o gástrico e o de mama HER2-positivo (Oliver et al., 2017), corroborando com a baixa taxa de sobrevivência em pacientes de carcinogênese prostática que apresentam alteração neste gene. Esses achados foram reforçados pela forte marcação imunohistoquímica da proteína *ARCN1* no adenocarcinoma prostático, destacando seu papel relevante nos desfechos clínicos e na progressão tumoral.

Conhecido como “*Decay-Accelerating Factor*” (DAF), o gene *CD55* codifica uma proteína que regula a atividade do sistema complemento. A superexpressão de *CD55* foi associada à progressão e à agressividade do câncer de próstata, uma vez que pacientes com níveis elevados da proteína DAF na urina tendem a apresentar uma forma mais agressiva da doença, o que pode levar a um pior prognóstico (Lima et al., 2022). Essa associação pode refletir uma maior liberação da proteína para o microambiente tumoral ou para a circulação, promovendo a regulação sistêmica do complemento e a evasão imunológica, mesmo com marcação imunohistoquímica mais discreta no tecido tumoral. Esses achados também foram corroborados em nosso modelo experimental, sugerindo que a superexpressão do *Cd55* é um fator comum na agressividade do câncer de próstata em ambos os organismos. A extrapolação dos dados de ratos para humanos, apoiada pela análise de sobrevida, sugere que o *CD55* pode ser um biomarcador útil tanto para prognóstico quanto para entender a progressão do câncer de próstata.

O gene CRIP2 é outro que, ao apresentar alterações gênicas, pode estar associado a menor sobrevida no câncer de próstata. Li et al. (2021) demonstrou que a superexpressão do gene CRIP2 parece regular a apoptose e o ciclo celular no câncer de pulmão em resposta à radiação, sugerindo resistência das células cancerígenas ao tratamento radioterápico. Em nosso estudo observou-se superexpressão do Crip2, que ao extrapolar para dados humanos, é possível destacar que alterações nesse gene estão ligadas à menor sobrevida, reforçando o papel desse gene em processos oncológicos tanto em modelos animais quanto em humanos. Esse impacto foi corroborado pela forte imunorreatividade observada no tecido tumoral prostático, evidenciando a relevância do CRIP2 nos processos de agressividade tumoral e resposta inflamatória, contribuindo para desfechos clínicos desfavoráveis.

Embora ainda não existam estudos que conectem diretamente o gene *MFSD4A* ao câncer de próstata, dados de expressão gênica indicam sua presença em tecidos prostáticos. Esse gene faz parte da família *Major Facilitator Superfamily* (MFS) e tem sido associado ao transporte de moléculas através de membranas celulares em diferentes contextos cancerígenos. A expressão diferencial observada em outros tipos de câncer sugere que o *MFSD4A* pode desempenhar funções importantes na regulação tumoral. No estudo de Yang et al. (2022) sobre o carcinoma nasofaríngeo, o gene *MFSD4A* agiu como um importante supressor tumoral inibindo a ativação da via PI3K-AKT-ERK1/2, que está fortemente associada à proliferação celular e à EMT. Ao conectar esses achados com a hipótese de compensação biológica, pode-se sugerir que a presença do *MFSD4A* em tecidos prostáticos do presente estudo, mesmo sendo um gene supressor, reflete uma tentativa de compensação celular diante do desenvolvimento tumoral (Bergholz & Zhao, 2021). Esse papel é corroborado pela imunorreatividade moderada observada nos tecidos de adenocarcinoma de próstata, indicando uma expressão intermediária que pode estar relacionada a mecanismos específicos de regulação tumoral. Nesse contexto, a superexpressão do *MFSD4A* poderia representar uma resposta do organismo para tentar conter a proliferação celular descontrolada. Assim, o *MFSD4A* pode ser insuficiente para combater o ambiente tumoral mais agressivo, sugerindo uma tentativa de contenção diante de outras forças oncogênicas.

Os genes *ARCN1*, *CD55*, *CRIP2* e *MFSD4A*, destacados na análise de sobrevida, apesar de suas diferentes funções biológicas, estão envolvidos na

modulação de processos cruciais para a sobrevivência e adaptação celular, como proliferação, apoptose e resposta ao ambiente tumoral. A correlação desses genes com a sobrevida dos pacientes sugere que eles não apenas participam da dinâmica tumoral, mas também podem servir como importantes biomarcadores para prever o curso da doença. No entanto, é importante destacar como uma limitação deste estudo a necessidade de extrapolação de dados de modelos murinos para humanos. Embora o uso de modelos animais seja uma prática comum e essencial na pesquisa biomédica, diferenças fisiológicas e genéticas entre as espécies podem limitar a aplicabilidade direta dos resultados em seres humanos. Dessa forma, futuros estudos clínicos são necessários para validar esses achados e determinar com maior precisão como esses genes influenciam a progressão do câncer de próstata em humanos.

Os resultados deste estudo ganham ainda mais relevância considerando que os animais utilizados, na fase adulta, já apresentavam lesões pré-neoplásicas, uma condição que está intimamente relacionada com o envelhecimento. Visto que o câncer de próstata é uma doença com maior incidência em indivíduos idosos (Bergengren et al., 2023), os achados em animais adultos sugerem que o processo carcinogênico pode ser iniciado ou acelerado devido à exposição prolongada a DEs, mesmo antes da idade avançada. Tal fato chama a atenção para a possibilidade de, com o envelhecimento, esses animais desenvolverem lesões ainda mais severas. Isso reforça a necessidade de cautela com a exposição a DEs, com o intuito de prevenir perturbações na saúde prostática ao longo do envelhecimento.

5. Conclusão

Em síntese, o presente estudo demonstrou que a exposição prolongada a DEs provoca alterações significativas na histoarquitetura prostática, evidenciando lesões pré-neoplásicas. Essas alterações teciduais foram acompanhadas por mudanças moleculares relacionadas a processos críticos, como proliferação celular e apoptose. Além disso, a associação entre a superexpressão de genes em ratos e a menor taxa de sobrevida em pacientes com câncer de próstata destaca o papel da exposição ambiental na promoção da carcinogênese.

Conflito de interesse:

Os autores relatam que não há conflito de interesse

Financiamento:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP: 2019/24044-0

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU638>
- Andrews, S., 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Aquino, A.M., Alonso-Costa, L.G., Santos, S.A.A., Rocha, V.A., Barbisan, L.F., Bedrat, A., Justulin, L.A., Flaws, J.A., Lemos, B., Scarano, W.R., 2023. Integrated transcriptome and proteome analysis indicates potential biomarkers of prostate cancer in offspring of pregnant rats exposed to a phthalate mixture during gestation and lactation. *Chemosphere* 341. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.140020>
- Axelstad, M., Christiansen, S., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P.R., Isling, L.K., Kortenkamp, A., Hass, U., 2014. Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reproduction* 147, 489–501. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0447>
- Bergengren, O., Pekala, K.R., Matsoukas, K., Fainberg, J., Mungovan, S.F., Bratt, O., Bray, F., Brawley, O., Luckenbaugh, A.N., Mucci, L., Morgan, T.M., Carlsson, S. V., 2023. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors-A Systematic Review. *Eur. Urol.* 84, 191–206. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2023.04.021>
- Boberg, J., Johansson, H.K.L.K.L., Hadrup, N., Dreisig, K., Berthelsen, L., Almstrup, K., Vinggaard, A.M.M., Hass, U., 2015. Perinatal exposure to mixtures of anti-androgenic chemicals causes proliferative lesions in rat prostate. *Prostate* 75, 126–140. <https://doi.org/10.1002/pros.22897>

- Cannarella, R., Condorelli, R.A., Barbagallo, F., La Vignera, S., Calogero, A.E., 2021. Endocrinology of the Aging Prostate: Current Concepts. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 12. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.554078>
- Chandrasekar, T., Yang, J.C., Gao, A.C., Evans, C.P., 2015. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl. Androl. Urol.* 4, 365–380. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2223-4683.2015.05.02>
- Christiansen, S., Kortenkamp, A., Axelstad, M., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P.R., Faust, M., Lichtensteiger, W., Schlumpf, M., Burdorf, A., Hass, U., 2012. Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int. J. Androl.* 35, 303–316. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2605.2011.01242.X>
- Czarnywojtek, A., Jaz, K., Ochmanska, A., Zgorzalewicz-Stachowiak, M., Czarnocka, B., Sawicka-Gutaj, N., Ziołkowska, P., Krela-Kazmierczak, I., Gut, P., Florek, E., Ruchała, M., 2021. The effect of endocrine disruptors on the reproductive system - Current knowledge. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 25, 4930–4940. https://doi.org/10.26355/EURREV_202108_26450
- Dudley, W.N., Wickham, R., Coombs, N., 2016. An Introduction to Survival Statistics: Kaplan-Meier Analysis. *J. Adv. Pract. Oncol.* 7, 91. <https://doi.org/10.6004/JADPRO.2016.7.1.8>
- ECHA, 2012. Guidance on information requirements and chemical safety assessment.
- Feng, D., Li, L., Li, D., Wu, R., Zhu, W., Wang, J., Ye, L., Han, P., 2023. Prolyl 4-hydroxylase subunit beta (P4HB) could serve as a prognostic and radiosensitivity biomarker for prostate cancer patients. *Eur. J. Med. Res.* 28. <https://doi.org/10.1186/S40001-023-01215-2>
- Fu, X., Liu, J., Liu, D., Zhou, Y., Guo, Y., Wang, Z., Yang, S., He, W., Chen, P., Wang, X., DiSanto, M.E., Zhang, X., 2022. Glucose-regulated protein 78 modulates cell growth, epithelial-mesenchymal transition, and oxidative stress in the hyperplastic prostate. *Cell Death Dis.* 13. <https://doi.org/10.1038/S41419-022-04522-4>
- Hafezi, S.A., Abdel-Rahman, W.M., 2019. The Endocrine Disruptor Bisphenol A (BPA) Exerts a Wide Range of Effects in Carcinogenesis and Response to Therapy. *Curr. Mol. Pharmacol.* 12, 230. <https://doi.org/10.2174/1874467212666190306164507>

- Huggins, C., Hodges, C. V., 1972. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA. Cancer J. Clin.* 22, 293–297. <https://doi.org/10.3322/CANJCLIN.22.4.232>
- Isling, L.K.K., Boberg, J., Jacobsen, P.R.R., Mandrup, K.R.R., Axelstad, M., Christiansen, S., Vinggaard, A.M.M., Taxvig, C., Kortenkamp, A., Hass, U., 2014. Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters. *Reproduction* 147, 465–476. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0448>
- Ittmann, M., 2018. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A030346>
- Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S.L., 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 2015 124 12, 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- Lam, H.M., Ho, S.M., Chen, J., Medvedovic, M., Tam, N.N.C., 2016. Bisphenol A disrupts HNF4 α -regulated gene networks linking to prostate preneoplasia and immune disruption in noble rats. *Endocrinology* 157, 207–219. https://doi.org/10.1210/EN.2015-1363/SUPPL_FILE/EN-15-1363.PDF
- Li, F., Bing, Z., Chen, W., Ye, F., Liu, Y., Ding, L., Jin, X., 2021. Prognosis biomarker and potential therapeutic target CRIP2 associated with radiosensitivity in NSCLC cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 584, 73–79. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2021.11.002>
- Lima, T., Barros, A.S., Trindade, F., Ferreira, R., Leite-Moreira, A., Barros-Silva, D., Jerónimo, C., Araújo, L., Henrique, R., Vitorino, R., Fardilha, M., 2022. Application of Proteogenomics to Urine Analysis towards the Identification of Novel Biomarkers of Prostate Cancer: An Exploratory Study. *Cancers (Basel)*. 14. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14082001>
- Loberg, R.D., Wojno, K.J., Day, L.L., Pienta, K.J., 2005. Analysis of membrane-bound complement regulatory proteins in prostate cancer. *Urology* 66, 1321–1326. <https://doi.org/10.1016/J.UROLOGY.2005.06.094>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9>

- Luo, L., Li, P., Xie, Q.Z., Wu, Y.C., Qin, F.Q., Liao, D.M., Zeng, K., Wang, K.N., 2024. n6-methyladenosine-modified circular RNA family with sequence similarity 126, member A affects cholesterol synthesis and malignant progression of prostate cancer cells by targeting microRNA-505-3p to mediate calnexin. *J. Cancer* 15, 966–980. <https://doi.org/10.7150/JCA.89135>
- Nyamao, R.M., Wu, J., Yu, L., Xiao, X., Zhang, F.M., 2019. Roles of DDX5 in the tumorigenesis, proliferation, differentiation, metastasis and pathway regulation of human malignancies. *Biochim. Biophys. acta. Rev. cancer* 1871, 85–98. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2018.11.003>
- Oliver, D., Ji, H., Liu, P., Gasparian, A., Gardiner, E., Lee, S., Zenteno, A., Perinskaya, L.O., Chen, M., Buckhaults, P., Broude, E., Wyatt, M.D., Valafar, H., Peña, E., Shtutman, M., 2017. Identification of novel cancer therapeutic targets using a designed and pooled shRNA library screen. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/SREP43023>
- Scarano, W.R., Pinho, C.F., Pissinatti, L., Gonçalves, B.F., Mendes, L.O., Campos, S.G.P., 2018. Cell junctions in the prostate: an overview about the effects of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCS) in different experimental models. *Reprod. Toxicol.* 81, 147–154. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2018.08.009>
- Sousa, T.C., de Souza, L.P., Ricardo, M.L.S., Yoshigae, A.Y., Hinokuma, K.D., Gorzoni, A.B.R., de Aquino, A.M., Scarano, W.R., de Sousa Castillho, A.C., Tavares, M.E.A., Veras, A.S.C., Teixeira, G.R., Nai, G.A., de Oliveira Mendes, L., 2023. Long exposure to a mixture of endocrine disruptors prediposes the ventral prostate of rats to preneoplastic lesions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 30, 104015–104028. <https://doi.org/10.1007/S11356-023-29768-Z>
- Wang, K., Huang, D., Zhou, P., Su, X., Yang, R., Shao, C., Ma, A., Wu, J., 2022. Individual and Combined Effect of Bisphenol A and Bisphenol AF on Prostate Cell Proliferation through NF- κ B Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/IJMS232012283>
- Welén, K., Damber, J.E., 2022. Androgens, aging, and prostate health. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 23, 1221. <https://doi.org/10.1007/S11154-022-09730-Z>
- Williams, P.L., Warwick, R., Dyson, M., Bannister, L.H., 1995. *Gray's Anatomy*, 37^a. ed. Churchill Livingstone, London, Rio de Janeiro.
- Xing, Z., Ma, W.K., Tran, E.J., 2019. The DDX5/Dbp2 subfamily of DEAD-box RNA

- helicases. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 10. <https://doi.org/10.1002/WRNA.1519>
- Yang, H., Qin, G., Luo, Z., Kong, X., Gan, C., Zhang, R., Jiang, W., 2022. MFSD4A inhibits the malignant progression of nasopharyngeal carcinoma by targeting EPHA2. *Cell Death Dis.* 13. <https://doi.org/10.1038/S41419-022-04793-X>
- Zheng, X., Amos, C.I., Frost, H.R., 2020. Comparison of pathway and gene-level models for cancer prognosis prediction. *BMC Bioinformatics* 21. <https://doi.org/10.1186/S12859-020-3423-Z>

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

08/04/2020

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 6834 e tendo como participante(s) MARIA LUIZA SILVA RICARDO (discente), WELLERSON RODRIGO SCARANO (participante externo), ANTHONY CESAR DE SOUZA CASTILHO (discente), LEONARDO DE OLIVEIRA MENDES (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

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

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

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	ANIMAL VIVO				Origem
		Peso	Idade	Sexo		
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. Welson Rodrigues Garcia Jr.
 Coordenador Científico da CPDI


 Prof.ª Ms. Adriana Falco de Brito
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18 2029-2079 - cpdi@unoeste.br
 Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 2029-2079 - cep@unoeste.br
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - 18 2029-2079 - cea@unoeste.br

valide este documento em www.unoeste.br/legis informando o código de segurança cd3e30a0fee43e505e38fc24fa8bb620

<https://www.unoeste.br/SQP/certificados/ver.asp?h=cd3e30a0fee43e505e38fc24fa8bb620>

1/1

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF DEVELOPMENTAL ORIGINS OF HEALTH AND DISEASE

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).

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. 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 enrollment. 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.

Originality and copyright

To be considered for publication in J DOHaD, a manuscript cannot have been published previously, nor can it be under review for publication elsewhere. (Previously published figures may be sparingly used in Reviews, with appropriate permission.) The posting of a brief summary of clinical trial outcomes on a pharmaceutical website (such as the PhRMA-sponsored database www.clinicalstudyresults.org) will not necessarily count as prior publication nor impede full consideration of a manuscript: J DOHaD will look at this on a case-by-case basis to determine the extent of overlap between the trial data posted and the manuscript as submitted, and will decide whether the manuscript contains a sufficiently new perspectives or sufficient additional data for it to count as original. Authors should declare when submitting manuscripts that such data have already been posted and J DOHaD will review this sympathetically.

Papers with multiple authors are reviewed with the assumption that all authors have contributed materially to the research reported, have approved the submitted manuscript and concur with its submission to J DOHaD. A Copyright Transfer Agreement, with certain specified rights reserved by the author, must be signed and returned to the Editor by the senior author of accepted manuscripts (Signing on behalf of all the other authors), prior to publication. This is necessary for the wide distribution of research findings, and the protection of both author and the International Society for Developmental Origins of Health and Disease under copyright law.

Authorship

All individuals included as authors of papers must have contributed substantially to the scientific process leading up to the writing of the paper. Such contribution includes the conception and design of the project, the performance of experiments and the analysis and interpretation of data. In addition the author should have made a substantial contribution to drafting or critical revision of the manuscript for important intellectual content.

We are aware that authors sometimes receive assistance from technical writers, language editors and/or writing agencies in preparing manuscripts for publication. Such assistance must be noted in the cover letter and in the Acknowledgements section along with a declaration that the author(s) are entirely responsible for the scientific content of the paper. Failure to acknowledge assistance from technical writers, language editors and/or writing agencies in preparing manuscripts for publication in the Acknowledgements section may lead to disqualification of the paper.

Under no circumstances will J DOHaD accept submissions by writing or editorial agencies on behalf of authors and there will be no correspondence with writing or editorial agencies regarding submitted or revised manuscripts.

Manuscript submission

All manuscripts must be submitted online via the website: <http://mc.manuscriptcentral.com/dohad>

Detailed instructions for submitting your manuscript online can be found at the submission website by clicking on the 'Instructions and Forms' link in the top right of the screen; and then clicking on the 'Author Submission Instructions' icon on the following page. The Editor-in-Chief will acknowledge receipt of the manuscript, provide it with a manuscript reference number and assign it to an Associate Editor

and to reviewers. The reference number of the manuscript should be quoted in all correspondence with the J DOHaD Office and Publisher.

Initial Submission

The following instructions must be followed carefully:

- The preferred file format for submission is Microsoft Word; however you can also submit Adobe Acrobat (.pdf) files readable with Acrobat Reader. The tables and figures should be included in the same file.
- Word Perfect or other word-processor files or Macintosh-based files are not acceptable.
- Tables should be placed at the end of the document and not within the text.
- Do not use “enter” in order to start a new page. “Hard” page or section breaks must be used.
- A cover letter should be attached as a separate file. In the cover letter, the category under which the manuscript is submitted should be indicated and the corresponding author identified, including phone number, fax number and electronic mail address. The cover letter must include a statement regarding authorship (see Authorship section above).
- File-names should indicate the name of the first author of the paper or an abbreviated version thereof and the content of the file (text, tables, figures).
- Printed copies of the manuscript, tables and figures are not required and should not be sent.

Please note that correspondence regarding submitted and revised manuscripts will be with the Corresponding Author only.

Revised\Final Submission

- The uploaded manuscript must be in the form of a Word for Windows file with figures (prepared as instructed below) in separate files. Word Perfect or other word-processor files or Macintosh-based files are not acceptable.
- Do not use “enter” in order to start a new page. “Hard” page or section breaks must be used.
- Figures should be prepared using appropriate formats and saved as TIFF or JPEG files. It is essential that JPEGs are greater than 320dpi. PowerPoint files or figures “pasted” into Word files are not acceptable for revised or final submissions.
- File names should indicate the manuscript number assigned by the journal and the content of the file (text, figures).

Review process

Manuscripts submitted to J DOHaD including those for supplements will be reviewed by at least two external reviewers and evaluated by an Associate Editor. Authors are requested to suggest up to 4 reviewers who are especially qualified to referee the work and would not have a conflict of interest. Please provide the names, email addresses, fax numbers and mailing addresses of the suggested reviewers. If authors would prefer that a particular reviewer(s) not evaluate the paper, they may indicate this request with appropriate justification, which will be treated confidentially. Suggestions and requests regarding reviewers will be considered by the Editor without obligation to accept them.

Authors should note that manuscripts may be returned after initial review by the Editors if the paper is deemed unlikely to be reviewed favorably. This rapid rejection process enables the author to submit promptly for publication elsewhere.

Every effort will be made to provide the author with a review within 6 weeks of receipt of the manuscript. If the Editor requests that revisions be made to a manuscript before publication, a maximum of 3 months shall be allowed for preparation of the revision, except in unusual circumstances.

Manuscript preparation and style

The manuscript should be typed double-spaced throughout on 'Letter' or A4 paper. Pages should be numbered sequentially beginning with the Title Page. Margins should not be less than 2.5cm on all sides and the font should be clearly legible and uniform throughout.

A Short Title of up to forty-five characters should be provided on the title page and should be repeated at the top right of every following page. The names of the authors (e.g. Smith et al. or Smith and Jones) should be given at the top left of every page besides the title page.

The Abstract should be unstructured (i.e., no sub-headings) but must provide the reader with a self-contained summary of the paper. It should include a brief introduction to the paper, the method, the key findings, and the conclusions. A list of 3–5 key words or terms for indexing should follow the abstract.

The Body of the Manuscript should begin on page 3. For Regular Original Articles, Brief Reports, the formal should include: Introduction, Method, Results, Discussion and Acknowledgements. These should be followed on a new page by the References.

Tables should be consecutively numbered as they appear in the text (Table 1, etc.). Each Table should be typed on a separate sheet with the Table number and heading above and any note below.

Figures should be consecutively numbered as they appear in the text (Figure 1, 2 etc). Use italic letters for parts a, b, c etc. Use abbreviation (Fig), except where starting a new sentence. Legends should be provided for each Figure. Scale bars should be added to photomicrographs and other similar images. Figures (scale bars, pie charts, etc) should be presented in two dimensions only.

All figures submitted to Journal of Developmental Origins of Health and Disease will be published in colour on Cambridge Journals Online free of charge.

How to Ensure Colour Online

To maximize the probability that figures will be published in colour, authors are encouraged to follow these figure submission guidelines:

- Submit a colour graphic as either TIFF or EPS files
- Submit figures at approximately the size at which they are to reproduce so that reduction or enlargement is not necessary.
- Line artwork should be supplied in black and white mode at a resolution of 1200 dpi; combination artwork (line/tone) at a resolution of 800 dpi; black and white halftone artwork should be saved in 'grayscale' mode at a resolution of 300dpi; colour halftone artwork should be saved in CMYK mode at a resolution of 400 dpi.
- Submit multipart figures in one single electronic file.

Author Requirements

It is not necessary for authors to indicate that a figure should be displayed in colour. CUP will assume that any author who submits figures in colour wants and agrees to their being produced in colour online. It is the author's responsibility to declare otherwise. Colour figures must be submitted before the paper is accepted for publication, and cannot be received later in the process.

Exceptions to Free Colour:

- Colour figures submitted to Journal of Developmental Origins of Health and Disease will be published in colour free of charge with the following exceptions:
- The colour figure file is deemed unusable due to production standards or poor colour quality and must be converted to black and white.
- The author gives explicit instructions to convert the colour figure to black and white.

What to Expect

Authors will see these colour figures when viewing their author page proofs on screen. Authors will NOT be allowed to submit colour figures to replace black and white figures in the page proof stage.

The use of Abbreviations, except those that are widely used, is strongly discouraged. They should be used only if they contribute to better comprehension of the manuscript. Acronyms should be spelled out at first mention. Metric system (SI) units should be used.

J DOHaD encourages submissions from all over the world. Authors who are not fluent in written English are encouraged to seek assistance in this regard before submitting their manuscripts.

Acknowledgements

Here you may acknowledge individuals or organisations that provided advice and/or support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section. The Acknowledgements should be placed after the main body of the text before Financial Support. If there are no Acknowledgements, the title should be inserted followed by "None". Papers that do not include an Acknowledgements section will not be reviewed.

Financial Support

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. This is particularly important in the case of research that is supported by industry. Support from industry not only includes direct financial support for the study but also support in kind such as provision of medications, equipment, kits or reagents without charge or at reduced cost and provision of services such as statistical analysis. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)". Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding

agency, commercial or not-for-profit sectors.” The Financial Support statement should be placed after the Acknowledgements and before the Conflicts of Interest section. Papers that do not include a Financial Support statement will not be reviewed.

Conflicts of Interest

Conflict of interest exists when an author has interests that might inappropriately influence his or her judgement, even if that judgement is not influenced. Because of this, authors must disclose potentially conflicting interests so that others can make judgements about such effects. At the time of submission authors should disclose any financial arrangements or connections they may have that are pertinent to the submitted manuscript and that may be perceived as potentially biasing their paper. Non-financial interests that could be relevant in this context should also be disclosed. If no relevant interests exist, this should be stated. This requirement applies to all the authors of a paper and to all categories of papers including letters to the editor. The Conflicts of Interest section should be placed after Financial Support. If there are no interests to declare, the title should be inserted followed by “None”. Papers that do not include a Conflicts of Interest section will not be reviewed.

Ethical Standards

Where research involves human and/or animal experimentation, the following statements should be included (as applicable): “The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guidelines on human experimentation (please name) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008, and has been approved by the institutional committees (please name) .” and “The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national guides on the care and use of laboratory animals (please name) and has been approved by the institutional committee (please name).” The Ethical Standards statement should be placed after the Conflicts of Interest section before the References. If the research does not involve human and/or animal experimentation, this statement should be omitted. Papers reporting the results of human and/or animal experimentation that do not contain an Ethical Standards statement will not be reviewed. For more information on the ethical standards and procedures of Cambridge Journals, please visit Cambridge Journals Online.

The requirements of DOH are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the ICMJE, and authors are encouraged to consult the latest guidelines, which contain useful, general information about preparing scientific papers.

For more specialised instances of the type of trials used in your paper, please see more specific guidelines below.

Animal studies

For studies involving laboratory animals, authors should consult the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (<http://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>).

Systematic Review/Meta-Analyses

For systematic reviews and meta-analyses, authors should consult the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) Statement

(www.prisma-statement.org/). This policy includes all systematic reviews, including those for observational studies.

Randomised trials

For reporting results of randomised trials, authors should consult the CONSORT Statement (<http://www.consort-statement.org/>), which is an evidence-based, minimum set of recommendations for reporting randomized trials.

Supplemental on-line material

The online platform gives authors the opportunity to include data that would be impossible or impractical to include in the printed version. These data might substantially enhance the importance of the research and might also be of benefit to readers. Authors may include tables and figures as well as data such as videos, 3-D structures/images, extensive datasets and any other supplementary material not suitable for print duplication. All supplementary material must be submitted with the original manuscript. Supplementary data should be referred to in the text with the prefix "S" (e.g. Supplementary Table S1, Supplementary Figure S1). Supplementary files will not be copy-edited, and will be published as supplied.

References

References should be numbered consecutively (in superscript) as they appear in the text. Type the reference list with double-spacing on a separate sheet. References (using Index Medicus abbreviations) should appear in the style as demonstrated below. Please note that if six authors or more, the first three authors should be listed and then 'et al.'. Examples:

1. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr.* 2007; 97, 435-439.
2. Gilbert JS, Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 295, 1941-1952.
3. Mitchell M, Schulz SL, Armstrong DT, Lane M. Metabolic and Mitochondrial Dysfunction in Early Mouse Embryos Following Maternal Dietary Protein Intervention. *Biol Reprod.* 2009 [Epub ahead of print].
4. Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of health and disease: an overview. In *Developmental Origins of Health and Disease* (eds. Gluckman P, Hanson M), 2006; pp. 1-5. Cambridge University Press, Cambridge.

For work that is 'in press' i.e., accepted for publication but not yet published, '(In Press)' should be written in parenthesis and not the year of expected publication.

Proofs

The publisher reserves the right to copy-edit manuscripts. The corresponding author will receive page proofs for final proofreading. These should be checked and returned within 2 days of receipt. The publisher reserves the right to charge authors for excessive correction of non- typographical errors.

Offprints

The corresponding author will receive a PDF file of the article when it is published.

Cambridge Language Editing Service

Cambridge recommends that authors have their manuscripts checked by an English language native speaker before submission; this will ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.

[http://journals.cambridge.org/action/stream?pageId=8728&level=2&menu=Authors
&pageId=3608](http://journals.cambridge.org/action/stream?pageId=8728&level=2&menu=Authors&pageId=3608)

10th March 2016

ANEXO C – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CHEMOSPHERE

About the journal

Aims and scope

Chemosphere is an international journal designed for the publication of original communications on chemicals in the environment. Chemosphere, as a multidisciplinary journal, offers maximum dissemination of investigations related to environmental pollution including all aspects of the identification, quantification, behavior, fate, environmental toxicology, treatment, and remediation of contamination in the bio-, hydro-, litho- and atmosphere.

Chemosphere will publish:

- Original communications (research papers) describing important new discoveries or further developments in relevant fields of investigation
- Short communications
- Letters to the Editor
- Special, themed issues on relevant topics

All papers should demonstrate a high level of novelty, originality and uniqueness. The following sections and subject fields are included:

Environmental Chemistry

This section will publish manuscripts dealing with fundamental processes in the environment that are related to the behavior, fate, analysis, and alteration of organic and inorganic contaminants focused on the dynamics of contaminants in environmental compartments such as water, soil, sediment, particulate matter, organisms, consumer products, industrial products, dust and indoor/outdoor air. Only studies that are of significance to an international audience or lend themselves to interpretation at the global level should be submitted.

Topics of specific interest include, but not limited to, are:

- All aspects of emerging contaminants, persistent organic pollutants (e.g., PFAS, flame retardants, PCBs, dioxins, chlorinated paraffins), micro- and nanoplastics, pharmaceuticals, pesticides, other industrial chemicals, endocrine disruptors, etc.
- All aspects of trace metals, organometals, metalloids (e.g., arsenic) and radionuclides
- Environmental fate studies including transport, biodegradation, bioaccumulation, transformation and mineralisation of chemicals, deposition, atmospheric (photo)chemical processes, hydrolysis, redox processes and adsorption/desorption
- Novel environmental analytical methods
- Environmental modelling and quantitative structure-activity relationships to study fate and environmental dynamics
- Monitoring studies presenting new strategies, reports of novel contaminants, findings or interpretations of interest for an international readership
- Passive sampling (in air and water)
- Non-target and suspect screening

- Effect-directed analysis
- Natural marine toxins
- Cyanotoxins
- Nanopolymers, nanocomposites
- Air pollution (contaminants in air, particulate matter and NO_x, SO_x, ozone)
- Sensors (only if related to measuring environmental contaminants)

Not considered for publication are: studies on (micro)organisms, monitoring studies based on standard methodology, and/or only of regional importance, bibliometric reviews, studies dealing with nutrients in agricultural ecosystems, pesticide application studies, plant physiology studies, studies on improvement of fertilizers and crops, 3D-printing, antibiotic resistance (unless connected to exposure), noise, global warming, CO₂ storage, oil and gas exploration, energy production, hydrogen production, smoking, plant science, forestry, agriculture, occupational health, production of green products, biomedical applications, fish farming and purely analytical methodology studies.

Environmental Toxicology and Risk Assessment

The section on Environmental Toxicology and Risk Assessment covers all aspects of toxicology, i.e., the science of adverse effects of environmental contaminants on living organisms including humans, and the scientific risk assessment.

Topics of specific interest include, but not limited to, are:

- Adverse effects of contaminants in aquatic and terrestrial organisms
- Epidemiological studies on effects of chemicals in humans
- Biochemical studies related to mechanisms of adverse effects
- Toxicokinetics and metabolic studies on contaminants related to adverse effects
- Development and validation of testing methods based on living organisms or biological materials
- Adaptation
- Human biomonitoring
- Elucidation of mechanisms of toxic effects
- DNA and protein adducts
- In vitro assays and omics techniques
- Phytotoxicity
- Effects of nanomaterials, nano- and microplastics

Not considered are studies on biochemical effects of chemicals non-relevant to toxicology and studies reporting associations between contaminants and health effects without a clear understanding of the link between exposure to the contaminants and the observed health effects.

Treatment and Remediation

This section deals with papers about technologies that manage and/or reduce environmental contaminants, including reuse and recycling processes. The technology must be beyond a basic laboratory study or have obvious implications for current or potential treatment or remediation technologies and, for example, for any advanced oxidation process, the intermediates and/or the extent of mineralization of the targeted compound(s) and wastes must be quantified.

Topics of specific interest include, but not limited to, are:

- Advanced water and wastewater treatment processes and sludge management
- Produced water
- Drinking water
- Incineration
- Remediation including bio/phytoremediation employing new strategies
- Hydraulic fracturing
- Use of biochar amended soil to bind (e.g., herbicides)
- Nanotechnology
- Advanced oxidation processes
- Photolysis/photocatalysis and electrochemical and photo-assisted electrochemical methods
- Sonolysis/sonocatalysis
- Mechanochemical destruction (MCD)
- Natural treatment systems (riverbank filtration and aquifer recharge/recovery)
- Characterization of natural and effluent organic matter
- Technologies for recycle/reuse (e.g., of microbial fuel cell techniques)
- Gasification/pyrolysis for biomass-to-energy and energy recovery from waste streams

Not considered are studies that focus solely on the synthesis of new materials to be used in wastewater purification or remediation. Studies focusing on the removal of single contaminants are often less interesting for publication.

Article types

Chemosphere accepts the following article types.

Please note: papers of a routine nature and lacking originality, novelty and uniqueness will not be accepted for publication.

- Research papers that meet the Aims and Scope of the journal reporting original and previously unpublished work. The Editors generally encourage brevity for all Research Papers should preferably not exceed 6,500 words (excluding refs.)
- Short communications must not exceed 2,000 words and will be given priority for rapid publication. A Short Communication should be of significant scientific merit (a novel finding that warrants immediate publication).
- Letters to the Editor are a written discussion of papers published in the journal. Letters are accepted on the basis of new scientific insights on the particular topic, critical additional information, relevance to the published paper and timeliness. Authors will be invited to submit a Reply to respond to points raised. The Editor will decide on the publication of Letters and Replies based on scientific merit, importance to the raised issues, and interest to the general audience. Letters and Replies of an unprofessional or unscientific nature, or containing personal invective, will not be considered.
- Proposals for Special Issues composed predominantly of research papers that focus on a specific topic or theme will also be considered. Full information can be found [here](#). Editorials for Special issues are submitted by invitation only through the Editorial Manager portal.

Peer review

This journal follows a double anonymized review process. Your submission will initially be assessed by our editors to determine suitability for publication in this journal. If your submission is deemed suitable, it will typically be sent to a minimum of two reviewers for an independent expert assessment of the scientific quality. The decision as to whether your article is accepted or rejected will be taken by our editors. Authors who wish to appeal the editorial decision for their manuscript may submit a formal appeal request in accordance with the procedure outlined in [Elsevier's Appeal Policy](#). Only one appeal per submission will be considered and the appeal decision will be final.

- Read more about [peer review](#).
- Our editors are not involved in making decisions about papers which:
- they have written themselves.
- have been written by family members or colleagues.
- relate to products or services in which they have an interest.

Any such submissions will be subject to the journal's usual procedures and peer review will be handled independently of the editor involved and their research group. Read more about [editor duties](#).

Special issues and article collections

The peer review process for special issues and article collections follows the same process as outlined above for regular submissions, except, a guest editor will send the submissions out to the reviewers and recommend a decision to the journal editor. The journal editor oversees the peer review process of all special issues and article collections to ensure the high standards of publishing ethics and responsiveness are respected and is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles.

Open access

We refer you to our [open access information page](#) to learn about open access options for this journal.

Ethics and policies

Ethics in publishing

Authors must follow ethical guidelines stated in [Elsevier's Publishing Ethics Policy](#).

Submission declaration

When authors submit an article to an Elsevier journal it is implied that:

- the work described has not been published previously except in the form of a preprint, an abstract, a published lecture, academic thesis or registered report. See our policy on [multiple, redundant or concurrent publication](#).
- the article is not under consideration for publication elsewhere.
- the article's publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out.
- if accepted, the article will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

To verify compliance with our journal publishing policies, we may check your manuscript with our screening tools.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following:

1. The conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data.
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content.
3. Final approval of the version to be submitted.

All authors should agree to be accountable for all aspects of the work to ensure that the questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Changes to authorship

The editors of this journal generally will not consider changes to authorship once a manuscript has been submitted. It is important that authors carefully consider the authorship list and order of authors and provide a definitive author list at original submission.

The policy of this journal around authorship changes:

- All authors must be listed in the manuscript and their details entered into the submission system.
- Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should only be made prior to acceptance, and only if approved by the journal editor.
- Requests to change authorship should be made by the corresponding author, who must provide the reason for the request to the journal editor with written confirmation from all authors, including any authors being added or removed, that they agree with the addition, removal or rearrangement.
- Only in exceptional circumstances will the journal editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors post acceptance.
- Publication of the manuscript may be paused while a change in authorship request is being considered.
- Any authorship change requests approved by the journal editor will result in a corrigendum if the manuscript has already been published.
- Any unauthorised authorship changes may result in the rejection of the article, or retraction, if the article has already been published.

Declaration of interests

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias their work. Examples of potential competing interests include:

- Employment
- Consultancies
- Stock ownership
- Honoraria
- Paid expert testimony
- Patent applications or registrations
- Grants or any other funding

The [Declaration of Interests tool](#) should always be completed.

Authors with no competing interests to declare should select the option, "I have nothing to declare".

The resulting Word document containing your declaration should be uploaded at the "attach/upload files" step in the submission process. It is important that the Word document is saved in the .doc/.docx file format. Author signatures are not required.

We advise you to read our [policy on conflict of interest statements, funding source declarations, author agreements/declarations and permission notes](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of generative AI in scientific writing

Authors must declare the use of generative AI in scientific writing upon submission of the paper. The following guidance refers only to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process:

- Generative AI and AI-assisted technologies should only be used in the writing process to improve the readability and language of the manuscript.
- The technology must be applied with human oversight and control and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. Authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.
- Authors must not list or cite AI and AI-assisted technologies as an author or co-author on the manuscript since authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans.

The use of generative AI and AI-assisted technologies in scientific writing must be declared by adding a statement at the end of the manuscript when the paper is first

submitted. The statement will appear in the published work and should be placed in a new section before the references list. An example:

- Title of new section: Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process.
- Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the published article.

The declaration does not apply to the use of basic tools, such as tools used to check grammar, spelling and references. If you have nothing to disclose, you do not need to add a statement.

We advise you to read our [policy for authors on the use of generative AI](#) and AI-assisted technologies for Elsevier.

Please note: to protect authors' rights and the confidentiality of their research, this journal does not currently allow the use of Generative AI or AI-assisted technologies such as ChatGPT or similar services by [reviewers](#) or [editors](#) in the peer review and manuscript evaluation process. We are actively evaluating compliant AI tools and may revise this policy in the future.

Preprints

Preprint sharing

Authors may share preprints, anywhere and at any time, in line with Elsevier's [article sharing policy](#). Sharing preprints, such as on a preprint server, will not count as prior publication.

We advise you to read our policy on [multiple, redundant or concurrent publication](#).

Free preprint posting on SSRN

In support of [open science](#) this journal offers authors a free preprint posting service on [SSRN](#) to ensure early registration and dissemination of research and facilitate early citations and collaboration. Posting to SSRN is subject to SSRN's standard checks.

You will be provided with the option to release your manuscript on SSRN during the submission process. Agreeing to this option will have no effect on the editorial process or outcome, and your manuscript will remain publicly available and free to read on SSRN whether our editors accept or reject your manuscript.

You will receive an email when your preprint is posted online on SSRN and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned.

Corresponding authors must seek approval from all co-authors before agreeing to release a manuscript publicly on SSRN.

We advise you to read about [SSRN](#), including the [SSRN Terms of Use](#) and [SSRN FAQs](#) before selecting this option.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Authors should ensure their work uses inclusive language throughout and contains nothing which might imply one individual is superior to another on the grounds of:

- age
- gender
- race
- ethnicity
- culture
- sexual orientation
- disability or health condition

We recommend avoiding the use of descriptors about personal attributes unless they are relevant and valid. Write for gender neutrality with the use of plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default. Wherever possible, avoid using "he, she," or "he/she."

No assumptions should be made about the beliefs of readers and writing should be free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions.

These guidelines are meant as a point of reference to help you identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

There is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender. We offer the following guidance:

- Sex and gender-based analyses (SGBA) should be integrated into research design when research involves or pertains to humans, animals or eukaryotic cells. This should be done in accordance with any requirements set by funders or sponsors and best practices within a field.
- Sex and/or gender dimensions of the research should be addressed within the article or declared as a limitation to the generalizability of the research.
- Definitions of sex and/or gender applied should be explicitly stated to enhance the precision, rigor and reproducibility of the research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer.

We advise you to read the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER checklist](#) (PDF) on the EASE website, which offer systematic approaches to the use of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation.

For further information we suggest reading the rationale behind and recommended [use of the SAGER guidelines](#).

Definitions of sex and/or gender

We ask authors to define how sex and gender have been used in their research and publication. Some guidance:

- Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features such as chromosomal genotype, hormonal

levels, internal and external anatomy. A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth") and is in most cases based solely on the visible external anatomy of a newborn. In reality, sex categorizations include people who are intersex/have differences of sex development (DSD).

- Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society.

Jurisdictional claims

Elsevier respects the decisions taken by its authors as to how they choose to designate territories and identify their affiliations in their published content. Elsevier's policy is to take a neutral position with respect to territorial disputes or jurisdictional claims, including, but not limited to, maps and institutional affiliations. For journals that Elsevier publishes on behalf of a third party owner, the owner may set its own policy on these issues.

- Maps: Readers should be able to locate any study areas shown within maps using common mapping platforms. Maps should only show the area actually studied and authors should not include a location map which displays a larger area than the bounding box of the study area. Authors should add a note clearly stating that "map lines delineate study areas and do not necessarily depict accepted national boundaries". During the review process, Elsevier's editors may request authors to change maps if these guidelines are not followed.
- Institutional affiliations: Authors should use either the full, standard title of their institution or the standard abbreviation of the institutional name so that the institutional name can be independently verified for research integrity purposes.

Studies in humans and animals

Authors must follow [ethical guidelines](#) for studies carried out in humans and animals.

Studies in humans

Work which involves the use of human subjects should be carried out in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki: [Ethical principles for medical research involving human subjects](#).

Manuscripts should follow the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) recommendations](#) for the conduct, reporting, editing and publication of scholarly work in medical journals and aim to be representative of human populations in terms of sex, age and ethnicity. [Sex and gender terms](#) should be used correctly, as outlined by WHO (World Health Organization).

Manuscripts must include a statement that all procedures were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines and have been approved by the appropriate institutional committee(s). The statement should contain the date and reference number of the ethical approval(s) obtained.

Manuscripts must also include a statement that the privacy rights of human subjects have been observed and that informed consent was obtained for experimentation with human subjects.

This journal will not accept manuscripts that contain data derived from unethically sourced organs or tissue, including from executed prisoners or prisoners of conscience, consistent with recommendations by [Global Rights Compliance on Mitigating Human Rights Risks in Transplantation Medicine](#). For all studies that use human organs or tissues, sufficient evidence must be provided that these were procured in line with [WHO Guiding Principles on Human Cell, Tissue and Organ Transplantation](#). The source of the organs or tissues used in clinical research must be transparent and traceable. If your manuscript describes organ transplantation you must additionally declare within the manuscript that:

- autonomous consent free from coercion was obtained from the donor(s) or their next of kin.
- organs and/or tissues were not sourced from executed prisoners or prisoners of conscience.

Studies in animals

All animal experiments should comply with [ARRIVE \(Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments\) guidelines](#).

Studies should be carried out in accordance with [Guidance on the operation of the Animals \(Scientific Procedures\) Act 1986](#) and associated guidelines, [EU Directive 2010/63 for the protection of animals used for scientific purposes](#) or the [NIH \(National Research Council\) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) (PDF) or those of an equivalent internationally recognized body.

The sex of animals, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study must be indicated and a statement included in your manuscript that such guidelines as listed above have been followed.

Writing and formatting

File format

We ask you to provide editable source files for your entire submission (including figures, tables and text graphics). Some guidelines:

- Save files in an editable format, using the extension .doc/.docx for Word files and .tex for LaTeX files. A PDF is not an acceptable source file.
- Lay out text in a single-column format.
- Use spell-check and grammar-check functions to avoid errors.

We advise you to read our [Step-by-step guide to publishing with Elsevier](#).

Double anonymized peer review

This journal follows a double anonymized review process which means author identities are concealed from reviewers and vice versa. To facilitate the double anonymized review process, we ask that you provide your title page (including author details) and anonymized manuscript (excluding author details) separately in your submission.

The title page should include:

- Article title
- Author name(s)
- Affiliation(s)
- Acknowledgements
- Declaration of Interest statement
- Corresponding author address (full address is required)
- Corresponding author email address

The anonymized manuscript should contain the main body of your paper including:

- References
- Figures
- Tables
- Acknowledgements

It is important that your anonymized manuscript does not contain any identifying information such as author names or affiliations.

Read more about [peer review](#).

Title page

You are required to include the following details in the title page information:

- Article title. Article titles should be concise and informative. Please avoid abbreviations and formulae, where possible, unless they are established and widely understood, e.g., DNA).
- Author names. Provide the given name(s) and family name(s) of each author. The order of authors should match the order in the submission system. Carefully check that all names are accurately spelled. If needed, you can add your name between parentheses in your own script after the English transliteration.
- Affiliations. Add affiliation addresses, referring to where the work was carried out, below the author names. Indicate affiliations using a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the corresponding address. Ensure that you provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the email address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence for your article at all stages of the refereeing and publication process and also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about your results, data, methodology and materials. It is important that the email address and contact details of your corresponding author are kept up to date during the submission and publication process.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in your article was carried out, or the author was visiting during that time, a "present address" (or "permanent address") can be indicated by a footnote to the author's name. The address where the author carried out the work must be retained as their main affiliation address. Use superscript Arabic numerals for such footnotes.

Abstract

You are required to provide a concise and factual abstract which does not exceed 250 words. The abstract should briefly state the purpose of your research, principal results and major conclusions. Some guidelines:

- Abstracts must be able to stand alone as abstracts are often presented separately from the article.
- Avoid references. If any are essential to include, ensure that you cite the author(s) and year(s).
- Avoid non-standard or uncommon abbreviations. If any are essential to include, ensure they are defined within your abstract at first mention.

Keywords

You are required to provide 1 to 7 keywords for indexing purposes. Keywords should be written in English. Please try to avoid keywords consisting of multiple words (using "and" or "of").

We recommend that you only use abbreviations in keywords if they are firmly established in the field.

Highlights

You are required to provide article highlights at submission.

Highlights are a short collection of bullet points that should capture the novel results of your research as well as any new methods used during your study. Highlights will help increase the discoverability of your article via search engines. Some guidelines:

- Submit highlights as a separate editable file in the online submission system with the word "highlights" included in the file name.
- Highlights should consist of 3 to 5 bullet points, each a maximum of 85 characters, including spaces.

We encourage you to view example [article highlights](#) and read about the benefits of their inclusion.

Graphical abstract

You are required to provide a graphical abstract at submission.

The graphical abstract should summarize the contents of your article in a concise, pictorial form which is designed to capture the attention of a wide readership. A graphical abstract will help draw more attention to your online article and support readers in digesting your research. Some guidelines:

- Submit your graphical abstract as a separate file in the online submission system.
- Ensure the image is a minimum of 531 x 1328 pixels (h x w) or proportionally more and is readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi.
- Our preferred file types for graphical abstracts are TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

We encourage you to view example [graphical abstracts](#) and read about the benefits of including them.

Math formulae

- Submit math equations as editable text, not as images.
- Present simple formulae in line with normal text, where possible.
- Use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms such as X/Y.
- Present variables in italics.

- Denote powers of e by exp.
- Display equations separately from your text, numbering them consecutively in the order they are referred to within your text.

Tables

Tables must be submitted as editable text, not as images. Some guidelines:

- Place tables next to the relevant text or on a separate page(s) at the end of your article.
- Cite all tables in the manuscript text.
- Number tables consecutively according to their appearance in the text.
- Please provide captions along with the tables.
- Place any table notes below the table body.
- Avoid vertical rules and shading within table cells.

We recommend that you use tables sparingly, ensuring that any data presented in tables is not duplicating results described elsewhere in the article.

Figures, images and artwork

Figures, images, artwork, diagrams and other graphical media must be supplied as separate files along with the manuscript. We recommend that you read our detailed [artwork and media instructions](#). Some excerpts:

- When submitting artwork:
- Cite all images in the manuscript text.
- Number images according to the sequence they appear within your article.
- Submit each image as a separate file using a logical naming convention for your files (for example, Figure_1, Figure_2 etc).
- Please provide captions along with the artwork.
- Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX, text graphics may also be embedded in the file.

Artwork formats

When your artwork is finalized, "save as" or convert your electronic artwork to the formats listed below taking into account the given resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations:

- Vector drawings: Save as EPS or PDF files embedding the font or saving the text as "graphics."
- Color or grayscale photographs (halftones): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 300 dpi (for single column: min. 1063 pixels, full page width: 2244 pixels).
- Bitmapped line drawings: Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 1000 dpi (for single column: min. 3543 pixels, full page width: 7480 pixels).
- Combinations bitmapped line/halftones (color or grayscale): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 500 dpi (for single column: min. 1772 pixels, full page width: 3740 pixels).

Please do not submit:

- files that are too low in resolution (for example, files optimized for screen use such as GIF, BMP, PICT or WPG files).
- disproportionally large images compared to font size, as text may become unreadable.

Figure captions

All images must have a caption. A caption should consist of a brief title (not displayed on the figure itself) and a description of the image. We advise you to keep the amount of text in any image to a minimum, though any symbols and abbreviations used should be explained.

Provide captions in a separate file.

Color artwork

If you submit usable color figures with your accepted article, we will ensure that they appear in color online.

Please ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision. Learn more about [color and web accessibility](#).

For articles appearing in print, you will be sent information on costs to reproduce color in the printed version, after your accepted article has been sent to production. At this stage, please indicate if your preference is to have color only in the online version of your article or also in the printed version.

Generative AI and Figures, images and artwork

Please read our [policy on the use of generative AI and AI-assisted tools in figures, images and artwork](#), which states:

- We do not permit the use of Generative AI or AI-assisted tools to create or alter images in submitted manuscripts.
- The only exception is if the use of AI or AI-assisted tools is part of the research design or methods (for example, in the field of biomedical imaging). If this is the case, such use must be described in a reproducible manner in the methods section, including the name of the model or tool, version and extension numbers, and manufacturer.
- The use of generative AI or AI-assisted tools in the production of artwork such as for graphical abstracts is not permitted. The use of generative AI in the production of cover art may in some cases be allowed, if the author obtains prior permission from the journal editor and publisher, can demonstrate that all necessary rights have been cleared for the use of the relevant material, and ensures that there is correct content attribution.

Supplementary material

We encourage the use of supplementary materials such as applications, images and sound clips to enhance research. Some guidelines:

- Cite all supplementary files in the manuscript text.
- Submit supplementary materials at the same time as your article. Be aware that all supplementary materials provided will appear online in the exact same file type as received. These files will not be formatted or typeset by the production team.
- Include a concise, descriptive caption for each supplementary file describing its content.
- Provide updated files if at any stage of the publication process you wish to make changes to submitted supplementary materials.
- Do not make annotations or corrections to a previous version of a supplementary file.

- Switch off the option to track changes in Microsoft Office files. If tracked changes are left on, they will appear in your published version.

We recommend you upload research data to a suitable specialist or generalist repository. Please read our guidelines on [sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

Video

This journal accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. We encourage you to include links to video or animation files within articles. Some guidelines:

- When including video or animation file links within your article, refer to the video or animation content by adding a note in your text where the file should be placed.
- Clearly label files ensuring the given file name is directly related to the file content.
- Provide files in one of our [recommended file formats](#). Files should be within our preferred maximum file size of 150 MB per file, 1 GB in total.
- Provide "stills" for each of your files. These will be used as standard icons to personalize the link to your video data. You can choose any frame from your video or animation or make a separate image.
- Provide text (for both the electronic and the print version) to be placed in the portions of your article that refer to the video content. This is essential text, as video and animation files cannot be embedded in the print version of the journal.

We publish all video and animation files supplied in the electronic version of your article.

For more detailed instructions, we recommend that you read our guidelines on [submitting video content to be included in the body of an article](#).

Research data

We are committed to supporting the storage of, access to and discovery of research data, and our [research data policy](#) sets out the principles guiding how we work with the research community to support a more efficient and transparent research process.

Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Please read our guidelines on [sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

For this journal, the following instructions from our [research data guidelines](#) apply.

Option C: Research data deposit, citation and linking

You are required to:

- Deposit your research data in a relevant data repository.

- Cite and link to this dataset in your article.
- If this is not possible, make a statement explaining why research data cannot be shared.

Data statement

To foster transparency, you are required to state the availability of any data at submission.

Ensuring data is available may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you can state the reason why (e.g., your research data includes sensitive or confidential information such as patient data) during the submission process. This statement will appear with your published article on ScienceDirect.

Read more about the importance and benefits of providing a [data statement](#).

Data linking

Linking to the data underlying your work increases your exposure and may lead to new collaborations. It also provides readers with a better understanding of the described research.

If your research data has been made available in a data repository there are a number of ways your article can be linked directly to the dataset:

- Provide a link to your dataset when prompted during the online submission process.
- For some data repositories, a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.
- You can also link relevant data or entities within the text of your article through the use of identifiers. Use the following format: Database: 12345 (e.g. TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Learn more about [linking research data and research articles in ScienceDirect](#).

Research Elements

This journal enables the publication of research objects (e.g. data, methods, protocols, software and hardware) related to original research in [Elsevier's Research Elements journals](#).

Research Elements are peer-reviewed, open access journals which make research objects findable, accessible and reusable. By providing detailed descriptions of objects and their application with links to the original research article, your research objects can be placed into context within your article.

You will be alerted during submission to the opportunity to submit a manuscript to one of the Research Elements journals. Your Research Elements article can be prepared by you, or by one of your collaborators.

Article structure

Article sections

- Divide your article into clearly defined and numbered sections. Number subsections 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), then 1.2, etc.

- Use the numbering format when cross-referencing within your article. Do not just refer to "the text."
- You may give subsections a brief heading. Headings should appear on a separate line.
- Do not include the article abstract within section numbering.

Introduction

The introduction should clearly state the objectives of your work. We recommend that you provide an adequate background to your work but avoid writing a detailed literature overview or summary of your results.

Methods

The methods section should provide sufficient details about your materials and methods to allow your work to be reproduced by an independent researcher. Some guidelines:

If the method you used has already been published, provide a summary and reference the originally published method.

If you are quoting directly from a previously published method, use quotation marks and cite the source.

Describe any modifications that you have made to existing methods.

Results

Results should be clear and concise. We advise you to read the sections in this guide on supplying tables, artwork, supplementary material and sharing research data.

Discussion

The discussion section should explore the significance of your results but not repeat them. You may combine your results and discussion sections into one section, if appropriate. We recommend that you avoid the use of extensive citations and discussion of published literature in the discussion section.

Conclusion

The conclusion section should present the main conclusions of your study. You may have a stand-alone conclusions section or include your conclusions in a subsection of your discussion or results and discussion section.

Glossary

Please provide definitions of field-specific terms used in your article, in a separate list.

Abbreviations

Abbreviations which are not standard in the field should be defined in a footnote on the first page of your article.

Abbreviations which are essential to include in your abstract should be defined at first mention in your abstract, as well as in a footnote on the first page of your article.

Before submission we recommend that you review your use of abbreviations throughout your article to ensure that it is consistent.

Appendices

We ask you to use the following format for appendices:

Identify individual appendices within your article using the format: A, B, etc.

Give separate numbering to formulae and equations within appendices using formats such as Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc. and in subsequent appendices, Eq. (B.1), Eq. (B. 2) etc. In a similar way, give separate numbering to tables and figures using formats such as Table A.1; Fig. A.1, etc.

Theory and calculation

The theory section should lay the foundation for further work by extending the background you provided in the introduction to your article. The calculation section should represent a practical development from a theoretical basis.

Footnotes

We advise you to use footnotes sparingly. If you include footnotes in your article, ensure that they are numbered consecutively.

You may use system features that automatically build footnotes into text. Alternatively, you can indicate the position of footnotes within the text and present them in a separate section at the end of your article.

Acknowledgements

Include any individuals who provided you with help during your research, such as help with language, writing or proof reading, in the acknowledgements section. Include acknowledgements only in the title page since this journal follows a double anonymized peer review process. Do not add it as a footnote to your title.

Author contributions: CRediT

Corresponding authors are required to acknowledge co-author contributions using [CRediT \(Contributor Roles Taxonomy\)](#) roles:

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Funding acquisition
- Investigation
- Methodology
- Project administration
- Resources
- Software
- Supervision
- Validation
- Visualization
- Writing – original draft
- Writing – review and editing

Not all CRediT roles will apply to every manuscript and some authors may contribute through multiple roles.

We advise you to read [more about CRediT and view an example of a CRediT author statement](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

References within text

Any references cited within your article should also be present in your reference list and vice versa. Some guidelines:

- References cited in your abstract must be given in full.
- We recommend that you do not include unpublished results and personal communications in your reference list, though you may mention them in the text of your article.
- Any unpublished results and personal communications included in your reference list must follow the standard reference style of the journal. In substitution of the publication date add "unpublished results" or "personal communication."
- References cited as "in press" imply that the item has been accepted for publication.

Linking to cited sources will increase the discoverability of your research.

Before submission, check that all data provided in your reference list are correct, including any references which have been copied. Providing correct reference data allows us to link to abstracting and indexing services such as Scopus, Crossref and PubMed. Any incorrect surnames, journal or book titles, publication years or pagination within your references may prevent link creation.

We encourage the use of Digital Object Identifiers (DOIs) as reference links as they provide a permanent link to the electronic article referenced. See the example below,

though be aware that the format of such citations should be adapted to follow the style of other references in your paper.

DOI link example (for an article not yet in an issue):
VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>.

Reference format

This journal does not set strict requirements on reference formatting at submission. Some guidelines:

- References can be in any style or format as long as the style is consistent.
- Author names, journal or book titles, chapter or article titles, year of publication, volume numbers, article numbers or pagination must be included, where applicable.
- Use of DOIs is recommended.

Our journal reference style will be applied to your article after acceptance, at proof stage. If required, at this stage we will ask you to correct or supply any missing reference data.

Reference style

All citations in the text should refer to:

- Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication.
- Two authors: both authors' names and the year of publication.
- Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations can be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa. Examples: "as demonstrated (Allan, 2020a, 2020b; Allan and Jones, 2019)" or "as demonstrated (Jones, 2019; Allan, 2020). Kramer et al. (2023) have recently shown".

The list of references should be arranged alphabetically and then chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Handgraaf, T., Lupton, R.A., 2020. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2020.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Handgraaf, T., Lupton, R.A., 2022. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in a book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2023. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 2023. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2023).

Reference to a dataset:

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions [dataset]. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88) [software]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations

We ask you to abbreviate journal names according to the [List of Title Word Abbreviations](#) (LTWA).

Web references

When listing web references, as a minimum you should provide the full URL and the date when the reference was last accessed. Additional information (e.g. DOI, author names, dates or reference to a source publication) should also be provided, if known. You can list web references separately under a new heading directly after your reference list or include them in your reference list.

Data references

We encourage you to cite underlying or relevant datasets within article text and to list data references in the reference list.

When citing data references, you should include:

- author name(s)
- dataset title
- data repository
- version (where available)
- year
- global persistent identifier

Add [dataset] immediately before your reference. This will help us to properly identify the dataset. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

We ask you to mark preprints clearly. You should include the word "preprint" or the name of the preprint server as part of your reference and provide the preprint DOI.

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, use the formal publication as your reference.

If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but they are not yet formally published, you may reference the preprint.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in popular reference management software products. These include products that support [Citation Style Language \(CSL\)](#) such as [Mendeley Reference Manager](#).

If you use a citation plug-in from these products, select the relevant journal template and all your citations and bibliographies will automatically be formatted in the journal style. We advise you to [remove all field codes](#) before submitting your manuscript to any reference management software product.

If a template is not available for this journal, follow the format given in examples in the reference style section of this Guide for Authors.

Additional information

Each figure or table should be considered equal to 300 words. The number of figures and/or tables should not exceed a total amount of seven. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered. Manuscripts should also contain line numbering. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. In case you have serious reasons for submitting a paper that is longer than the aforementioned word limits, make sure you include convincing arguments in your cover letter. Please avoid lengthy submissions if possible.

