



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

VANDERLEI RAMOS GIMENEZ

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM PULMÕES DE RATOS EXPOSTOS A UMA
MISTURA DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS**

Presidente Prudente - SP
2024



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

VANDERLEI RAMOS GIMENEZ

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM PULMÕES DE RATOS EXPOSTOS A UMA
MISTURA DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS**

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

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Renata Calciolari Rossi

Co-orientador:
Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes

616.24
G491a

Gimenez, Vanderlei Ramos
Alterações morfológicas em pulmões de ratos
expostos a uma mistura de disruptores endócrinos \\
Vanderlei Ramos Gimenez, orientadora Renata Calciolari
Rossi. – Presidente Prudente, 2024.
40 f.: il.

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

1. Pulmões. 2. Ratos. 3. Alterações morfológicas. 4.
Disruptores endócrinos. 5. Toxicologia. 6. Histologia
pulmonar. 7. Patologia pulmonar. 8. Exposição a
substâncias químicas. I. Rossi, Renara Calciolari, orient.
II. Mendes, Leonardo de Oliveira, coorient. III. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO(A) CANDIDATO(A) **VANDERLEI RAMOS GIMENEZ**, REALIZADA NO DIA TREZE DE SETEMBRO DO ANO DE DOIS MIL E VINTE E QUATRO, NA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA - PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO.

Aos treze dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte e quatro, às oito horas e trinta minutos, o(a) Prof(a). Dr(a). **RENATA CALCIOLARI ROSSI**, orientador(a) do(a) mestrando(a) **VANDERLEI RAMOS GIMENEZ**, fez a abertura da sessão de arguição da Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Ciências da Saúde, por sistema presencial. Na condição de Presidente da Banca Examinadora, procedeu a chamada dos membros indicados e aprovados pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para compor a mesa, com os seguintes Doutores: **ANA CLARA CAMPAGNOLO GONÇALVES TOLEDO** (Unoeste - Universidade do Oeste Paulista - Presidente Prudente/SP) e **ANA KARINA MARQUES SALGE MENDONÇA** (UFG - Universidade Federal de Goiás/GO). Iniciados os trabalhos, a Presidência declarou para o conhecimento dos membros da Banca e do(a) Candidato(a), as normas que regem a defesa pública e definiu a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. A seguir o(a) candidato(a) passou a apresentação de sua dissertação intitulada: **“ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM PULMÕES DE RATOS EXPOSTOS A UMA MISTURA DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS”**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento, cujo resultado foi:

Aprovado(a) Reprovado (a)

Nada mais a tratar, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

Central de Assinaturas Eletrônicas

Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico
Status do documento: Concluído
Data de criação do documento: 18/09/2024 10:19
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília
Número de assinaturas: 3
Solicitante: IDALINA DE OLIVEIRA LIMA (#5898762)

Signatários do documento

RENATA CALCIOLARI ROSSI (PROFESSOR)

renata@unoeste.br

Recebido em 18/09/2024 10:19

Assinado em 18/09/2024 10:33

Assinatura Interna UNOESTE

Usando endereço IP: 177.131.39.1

ID da assinatura: 3787617

ANA CLARA CAMPAGNOLO GONÇALVES TOLEDO (PROFESSOR)

anaclara@unoeste.br

Recebido em 18/09/2024 10:19

Assinado em 18/09/2024 15:45

Assinatura Interna UNOESTE

Usando endereço IP: 177.131.39.1

ID da assinatura: 3787618

ANA KARINA MARQUES SALGE MENDONÇA (SIGNATÁRIO EXTERNO)

anasalge@gmail.com

Recebido em 18/09/2024 10:19

Assinado em 18/09/2024 11:42

Assinatura Interna UNOESTE

Usando endereço IP: 2804:389:a1c1:a6e7:8c8c:9461:7e07:a4fb

ID da assinatura: 3787619

URL do documento: <https://www.unoeste.br/ca/c96c7a08>

Assinatura digital do documento: 0d3968fdfe4dfaab15a0c3cdc56122fd4902f26d307002977929fdb62cd8d7

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela Associação Prudentina de Educação e Cultura - APEC

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus pela capacidade da existência terrena, paciência, resiliência, resignação e possibilidade de vivenciar novos desafios; dedico também a minha orientadora por sua doação pessoal na forma de entendimento, ajuda científica e estímulo na forma de ganho de potência durante a execução deste. Meus filhos Laura e Pedro, meus pais Lídia e José e a todos os professoras e professores que nesta digna Universidade conheci durante o período. Gratidão á todos pela lapidação de minha pessoa, incentivo a vida através da magia divina de ensinar e humanamente construir pessoas melhores.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Renata Calciolari Rossi, meus mais sinceros agradecimentos pelo seu comprometimento e orientação valiosa ao longo desta pesquisa. Sua expertise e dedicação foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

A todos que envolvidos em cada etapa desta pesquisa. Desde a fase de bioterismo, coleta de dados e análises dos resultados. Cada contribuição foi essencial para alcançar a excelência deste trabalho.

Quero estender meus agradecimentos à Universidade do Oeste Paulista pela oportunidade de realizar este estudo em suas instalações. Obrigado a todos que tornaram possível essa realização.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Alterações morfológicas em pulmões de ratos expostos a uma mistura de disruptores endócrinos

Os xenobióticos são componentes considerados estranhos ao organismo humano, dentre os quais se destacam os Disruptores Endócrinos (DEs), que são substâncias encontradas no meio ambiente em pequenas concentrações, mas suficientes para causarem efeitos adversos em animais e seres humanos expostos a longo prazo. Os pulmões possuem uma comunicação muito importante com o meio externo através do ar, o qual tem potencial para carrear milhares de toxinas e até mesmo microrganismos para o epitélio pulmonar, levando ao surgimento de variados efeitos adversos à saúde respiratória. Dessa forma, os DEs têm a capacidade de afetar diretamente esse órgão tão vital. Diante de tal cenário, torna-se evidente a importância de estudos que caracterizem a exposição à qual seres humanos e animais estão submetidos no meio ambiente. O objetivo deste estudo foi comparar os achados morfológicos em pulmões de ratos expostos ao DE. Foi realizado um estudo sobre os aspectos da relação fisiologia-ambiente na exposição a uma mistura de desreguladores endócrinos, utilizando ratos para avaliar a toxicidade dos DEs. Para tal, foi utilizada uma mistura de doze compostos químicos selecionados como representantes de outros DEs, mimetizando uma exposição humana à substância tóxica. A composição da mistura consistiu em doze compostos (ftalatos, pesticidas, filtros UV, bisfenol A, butilparabeno), predominantemente com propriedades inibidoras androgênicas, além da presença de quatro substâncias com características xenoestrogênicas. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo Ctrl (veículo: óleo de milho, por gavagem) e Grupo ED Mix (receberam 32,11 mg/kg/dia diluídos em óleo de milho [2 ml/kg], por gavagem). Após a lactação, as fêmeas da geração F1 foram mantidas recebendo água e ração *ad libitum* até completarem 365 dias de idade, quando foram eutanasiadas e os pulmões coletados. Não foram observadas alterações no escore de inflamação, mas foram encontradas alterações nos mastócitos. Em vista disso, concluímos que a exposição a DEs ao longo da vida induz danos pulmonares.

Palavras-chave: disruptores endócrinos, pulmão, exposição ambiental, sprague-dawley.

ABSTRACT

Morphological changes in the lungs of rats exposed to a mixture of endocrine disruptors

Xenobiotics are substances considered foreign to the human body, among which endocrine disruptors (EDs) are particularly notable. These substances are found in the environment at low concentrations, yet sufficient to cause adverse effects in animals and humans exposed over the long term. The lungs play a crucial role in communication with the external environment through the air, which has the potential to carry thousands of toxins and even microorganisms to the pulmonary epithelium, leading to various adverse effects on respiratory health. Consequently, EDs have the capacity to directly impact this vital organ. In this context, it is evident that studies characterizing exposure to which humans and animals are subjected in the environment are of great importance. This study aimed to compare the morphological findings in the lungs of rats exposed to EDs. An investigation was conducted into the aspects of the physiology-environment relationship in exposure to a mixture of endocrine disruptors, using rats to assess the toxicity of EDs. A mixture of twelve chemical compounds was used, selected as representatives of other EDs, mimicking human exposure to toxic substances. The composition of the mixture included twelve compounds (phthalates, pesticides, UV filters, bisphenol A, butylparaben), predominantly with androgenic inhibitory properties, along with four substances with xenoestrogenic characteristics. Pregnant Sprague-Dawley females were randomly divided into two experimental groups: Ctrl Group (vehicle: corn oil, by gavage) and ED Mix Group (received 32.11 mg/kg/day diluted in corn oil [2 ml/kg], by gavage). After lactation, F1 generation females were maintained with access to water and food ad libitum until they reached 365 days of age, at which point they were euthanized and their lungs collected. No changes were observed in the inflammation score, but alterations in mast cells were found. Therefore, we conclude that lifelong exposure to EDs induces pulmonary damage.

Keywords: endocrine disruptors, lung, environmental exposure, sprague-dawley;

LISTA DE SIGLAS

4-MBC	- 4-metil-benzidileno cânfora
BPA	- Bisfenol A
CAPI	- Comitê Assessor de Pesquisa Institucional
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPDI	- Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
DAG	- Distância ano-genital
DBP	- Di-n-butil ftalato
DEHP	- Di-(2-etilexil) ftalato
DEs	- Desregulador endócrino
DG0	- Dia gestacional 0
DG7	- Dia gestacional 7
DPN1	- Dia pós-natal 1
DPN21	- Dia pós-natal 21
DPN22	- Dia pós-natal 22
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
DAG	- Distância ano-genital
EPA	- Agência de Proteção Ambiental dos EUA
HE	- Hematoxilina e Eosina
NAPQI	- N-acetil-p-benzo-quinoneimina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 — Comparação da média (%) da relação da quantidade de células encontradas (reagentes – mastócitos) sobre a área (Cél./Área) das vias aéreas principais – Brônquios e Bronquíolos – analisadas..... 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 —	Composição da mistura, consumo humano individual ajustado dos compostos químicos e misturas 100x.....	19
Tabela 2 —	<i>Comparação entre os scores de inflamação dos grupos controle e submetidos à mistura de Disruptores Endócrinos (Mix 100x).....</i>	24

SUMÁRIO

ARTIGO - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM PULMÕES DE RATOS EXPOSTOS A UMA MISTURA DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS	13
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 Mistura DE	18
2.2 Delineamento experimental	20
2.3 Coleta dos materiais	21
2.4 Análise histopatológica.....	22
2.5 Análise estatística.....	23
3 RESULTADOS	23
4 DISCUSSÃO.....	25
5 CONCLUSÃO.....	27
6 CONFLITO DE INTERESSES	27
REFERÊNCIAS	27
ANEXOS.....	31

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM PULMÕES DE RATOS EXPOSTOS A UMA MISTURA DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Vanderlei Ramos Gimenez¹, João Pedro Dearo Reueiro¹, Leonardo de Oliveira Mendes^{1,2}, Renata Calciolari Rossi^{1,2}

Short Title: Desreguladores Endócrinos e Histopatologia Pulmonar

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

²Master Program in Health Science, Western São Paulo University (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572 – Bairro do Limoeiro, Presidente Prudente – SP-Brazil;

*Corresponding author

Renata Calciolari Rossi
E-mail: renata@unoeste.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico ao qual será submetido: Revista Medicina (Ribeirão Preto), Qualis: A3

RESUMO

Os xenobióticos, como os desreguladores endócrinos (DEs), presentes em baixas concentrações no ambiente, podem causar efeitos adversos em longo prazo em animais e humanos. Os pulmões, expostos a toxinas e microrganismos do ar, são especialmente vulneráveis. Este estudo visou comparar as alterações morfológicas nos pulmões de ratos expostos a uma mistura de DEs. Utilizou-se um modelo experimental para avaliar a toxicidade dos DEs, com uma mistura contendo doze compostos químicos representativos de diferentes DEs (ftalatos, pesticidas, filtros UV, bisfenol A e butilparabeno). Estes compostos foram escolhidos devido às suas propriedades inibidoras androgênicas e xenoestrogênicas, simulando a exposição humana a substâncias tóxicas. Fêmeas prenhes da linhagem Sprague-Dawley foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo Controle (recebendo óleo de milho) e Grupo ED Mix (expostos a 32,11 mg/kg/dia de DEs diluídos em óleo de milho). Após a lactação, as fêmeas da geração F1 foram mantidas com acesso livre a água e ração até atingirem 365 dias de idade, quando foram eutanasiadas e seus pulmões foram coletados para análise. Embora não tenham sido detectadas alterações significativas no escore de inflamação, observou-se uma modificação na população de mastócitos. Os resultados indicam que a exposição crônica a DEs pode induzir danos pulmonares.

Palavras-chave: disruptores endócrinos, pulmão, exposição ambiental, sprague-dawley;

ABSTRACT

Xenobiotics, such as endocrine disruptors (EDs), present in low concentrations in the environment, can cause long-term adverse effects in animals and humans. The lungs, exposed to airborne toxins and microorganisms, are particularly vulnerable. This study aimed to compare the morphological changes in the lungs of rats exposed to a mixture of EDs. An experimental model was used to assess the toxicity of EDs, with a mixture containing twelve chemical compounds representing different EDs (phthalates, pesticides, UV filters, bisphenol A, and butylparaben). These compounds were selected due to their androgenic inhibitory and xenoestrogenic properties, simulating human exposure to toxic substances. Pregnant Sprague-Dawley females were randomly divided into two experimental groups: Control Group (receiving corn oil) and ED Mix Group (exposed to 32.11 mg/kg/day of EDs diluted in corn oil). After lactation, F1 generation females were maintained with ad libitum access to water and food until 365 days of age, at which point they were euthanized, and their lungs were collected for analysis. Although no significant changes in inflammation scores were detected, modifications in mast cell populations were observed. The results suggest that chronic exposure to EDs may induce pulmonary damage.

Keywords: endocrine disruptors, lung, environmental exposure, sprague-dawley;

1 INTRODUÇÃO

A evolução da capacidade industrial permitiu produção em massa de produtos para consumo e uso diário da população. Trouxe consigo uma chuva de consequências derivadas da manipulação e liberação no meio ambiente de materiais tóxicos e cancerígenos. Estes, ao entrar em contato com indivíduos, causam consequências fisiológicas e metabólicas, sendo em áreas rurais ou principalmente em áreas urbanas onde, há a contaminação com os compostos químicos gerados de resíduos industriais, agrícolas e até mesmo de próprio uso cotidiano como os xenobióticos que estão presentes no meio ambiente.¹

Os xenobióticos são os componentes considerados estranhos ao organismo humano. Dentre esses compostos estão os Desreguladores Endócrinos ou Disruptores Endócrinos (DEs) os quais, de acordo com Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), são definidos como agentes que interferem em qualquer uma das etapas de funcionamento dos hormônios presentes no corpo humano e dos animais que são: síntese, secreção, transporte por carreadores, ligação, ação ou a excreção/eliminação do hormônio^{1,2}. Os DEs são substâncias encontradas no meio ambiente em concentrações pequenas, porém o suficiente para causarem efeitos adversos aos animais e seres humanos.

Os DEs não somente continuam sendo utilizados em contato com os seres humanos, são exemplos concretos: Bisfenol A (BPA), di-n-butil ftalato (DBP) e di-2-etilexil-ftalato (DEHP) presentes em garrafas de águas, canos PVC, além de recipientes para armazenamento e consumo de alimentos líquidos e água, somados ao 4-metil-benzidileno cânfora (4-MBC) um xenoestrógeno e está presente em protetores solares contra a UV-B^{3,4}. Seu uso está em ascendência como demonstrado em um estudo realizado em 2005 nos Estados Unidos revelando que 95% das amostras de urina estavam contaminadas com BPA comprovando o aumento da exposição humana ao composto².

Além disso, os pulmões são os responsáveis pela metabolização e até mesmo a excreção dos xenobióticos ingeridos oralmente através de alimentos e água contaminada e/ou inalados. Em estudos realizados com ratos, demonstraram que a exposição fetal ao BPA causa alteração morfológica de

diversos órgãos do animal adulto como pulmões, a próstata, útero, vagina e glândulas mamárias além de causar mudanças no comportamento dos expostos e levando-os também à obesidade ^{1,5,6,7}.

Em estudos experimentais com ratos utilizando a administração do DEHP houve mudanças morfológicas observáveis nos pulmões incluindo apoptose e necrose. Houve diferença estatisticamente significativa da massa relativa dos pulmões demonstrando que os DEHP quando administrados em doses de 2,85 mg/Kg de peso resultam em uma hiperplasia de nódulos linfóides associados aos brônquios com grande área de infarto hemorrágico e um acentuado espessamento de septos intra-alveolares^{8,9}.

Apesar da grande quantidade de estudos presentes na literatura a respeito dos DEs, não existe nenhum estudo que realize análise de epitélio pulmonar utilizando a leitura e pesquisa de alterações morfométricas e histopatológicas do tecido, relacionando os efeitos, consequências e alterações pulmonares^{1,3,10}. Diante de tal cenário, torna-se evidente a importância de estudos que caracterizem a exposição a qual seres humanos e animais no meio-ambiente estão submetidos.

Assim, a presente proposta tem como objetivo comparar os achados morfológicos em pulmões de ratos expostos ao DE.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O material utilizado para confecção deste estudo os quais são os tecidos pulmonares provém de doação entre pesquisadores e o projeto inicial, intitulado de “Caracterização da tríade exposição-gene-doença: Efeitos de uma mistura de desreguladores endócrinos baseada na exposição humana sobre o microambiente prostático” cujos procedimentos, administração de drogas, a anestesia e eutanásia estão de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) foi aprovado pelo Comitê Assessor de Pesquisa Institucional (CAPI) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) sob o protocolo de número 6034. O estudo foi cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o protocolo de número 7737.

2.1 Mistura de DE

Foi realizado um projeto de pesquisa referente aos aspectos da relação fisiologia-ambiente na exposição a uma mistura de desreguladores endócrinos através da utilização de ratos para a exposição dos DEs e avaliação da sua toxicidade aos animais expostos. Foi utilizada uma mistura adaptada de doze compostos químicos, determinados por Christiansen et al. (2012), selecionados como representantes de outros DEs, simulando uma exposição à substância tóxica ao ser humano¹¹.

Tratando-se das doses e toxicidade ao ser humano em relação aos roedores, claramente os valores são discrepantes, assim as doses adotadas para os estudos, valem-se de valores 100 a 450 vezes maior que a exposição humana; porém obteve-se o cuidado em incluir substâncias que, além de serem relevantes para determinar a exposição ambiental mantivessem o experimento possível¹¹.

A composição da mistura constitui-se de 2 ftalatos: di-n-butil ftalato (DBP) e DEHP; 5 pesticidas: vinclozin, procloraz, procimidona, linuron, epoxiconazol; o metabólito do pesticida DDT, diclorodifenil-dicloroetileno (p,p'-DDE). Esses 8 compostos são caracterizados por possuírem, propriedades inibidoras androgênicas. Contou também com a presença de quatro substâncias xenoestrogênicas: dois filtros U.V., o metoxinamato de octila (OMC) e o 4-metilbenzidileno cânfora (4-MBC); o composto fenólico BPA; o preservativo antifúngico butilparabeno^{11,12}.

A mistura passou por adaptações quando comparada à original, através da remoção do paracetamol, da sua composição devido ao potencial de hepatotoxicidade através do metabólito gerado na metabolização dessa droga, o NAPQI (N-acetil-p-benzo-quinoneimina)^{13,14}.

A mistura adaptada de DEs, desenvolvida por Christiansen et al., (2012) e reproduzida por Axelstad et al. (2014) e Isling et al. (2014) foi administrada ao Grupo Tratado Mix 100x^{11,15,16}. A composição da mistura é descrita detalhadamente na Tabela 1.

Tabela 1. Composição da mistura, consumo humano individual ajustado dos compostos químicos e misturas 100x

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

Ver referências para mais informações detalhadas sobre as estimativas do consumo humano e para as concentrações ajustadas da mistura

2.2 Delineamento Experimental

Durante o delineamento experimental, foram adquiridos, no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP): 24 fêmeas adultas com 120 dias de idade e pesando aproximadamente 300g e 10 machos adultos com 90 dias de idade e pesando aproximadamente 300g da linhagem Sprague-Dawley. Mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos da UNOESTE, em condições controladas de luminosidade (Através de 12 horas de luz para 12 horas de escuro), temperatura (média de 23°C a 25°C), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$) e recebendo água e ração *ad libitum*.

Realizou-se acasalamentos no período escuro do ciclo, com a inserção de duas a três fêmeas na gaiola do macho feita de polipropileno com 41x34x16cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada. Trocou-se as gaiolas e as maravalha 2 vezes por semana.

O dia zero de prenhez (DG0) foi marcado pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais das fêmeas em proestro e as ratas prenhes foram separadas randomicamente em dois grupos experimentais (n=12/grupo): O Grupo Controle (n=12) com utilização e administração de veículo de óleo de milho (placebo), por gavagem e o Grupo Mix 100x (n=12) os quais receberam 168 mg/kg/dia da mistura de DEs, conforme descrito na Tabela 1, diluídos em óleo de milho através de 2 ml/kg. A concentração da diluição no óleo de milho foi de 30,11 mg/kg/dia e administrada através de gavagem.

As ratas prenhes ou lactentes receberam o tratamento no dia gestacional 7 (DG7) até o dia pós-natal 21 (DPN21), sempre no mesmo período (entre às 8h e 10h). Foram mantidas em gaiolas individuais, com a realização de pesagens em dias alternados para permissão do cálculo do volume da mistura dos DEs a serem administrados juntamente à investigação de sinais clínicos e de toxicidade.

Após o nascimento dos filhotes, no dia pós-natal 1 (DPN1), determinou-se a distância ano-genital (DAG) da prole, de modo a diferenciar os machos das fêmeas. O número por ninhada foi reduzido para 8 e mantida a proporção entre machos e fêmeas de 1:1 sempre quando foi possível e assim as ninhadas com número de filhotes menor que sete não foram utilizadas na pesquisa deste

trabalho. No dia pós-natal 22 (DPN 22) realizou-se o desmame de filhotes machos, os quais foram alojados em caixas de Grupo controle e de Grupo Mix 100x contendo dois animais cada.

Os filhotes, já desmamados, continuaram recebendo o tratamento com a mistura dos DEs até os 180 dias de idade e foram mantidos até atingirem 365 dias de idade, recebendo somente água e ração *ad libitum*, quando foram eutanasiados e exsanguinados. As mães e as ninhadas fêmeas, foram destinadas à eutanásia.

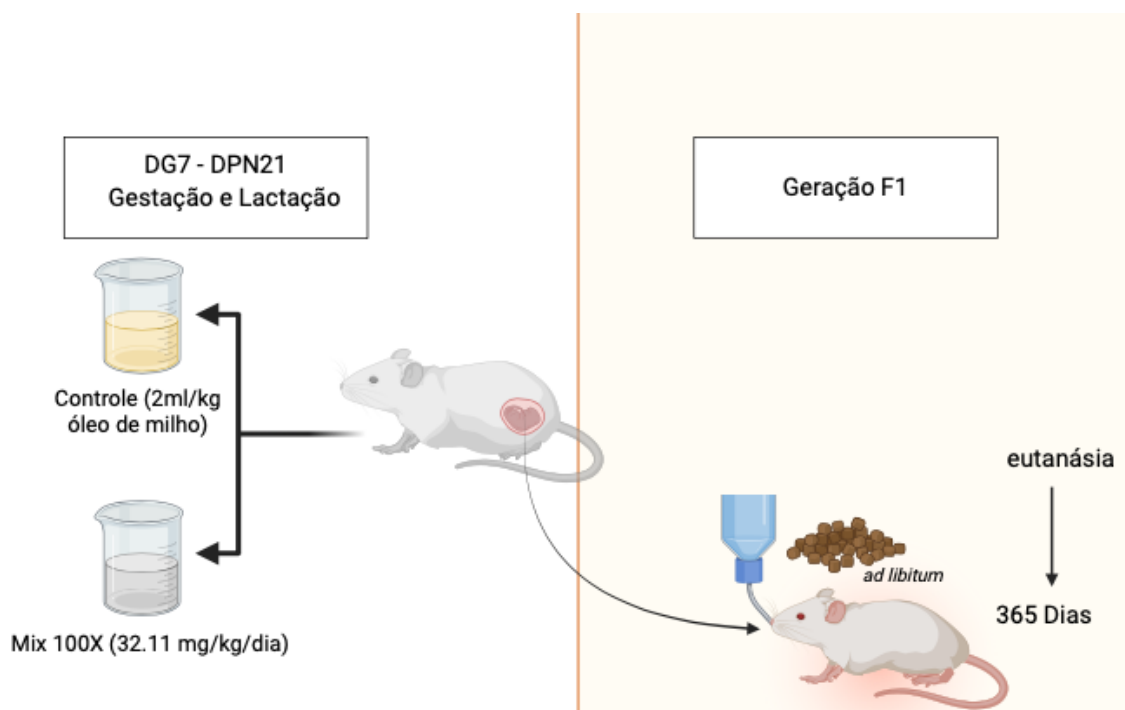


Figura 1- Representação esquemática do delineamento experimental. As linhas referem-se ao período de exposição das ratas prenhas (GD07 a PND21) com a mistura de 12 DE. Período da eutanásia (PDN365).

2.3 Coleta dos materiais

Os animais de escolha para análise neste estudo foram os filhotes machos das ratas expostas aos DEs do grupo Mix 100x, considerados o grupo exposto, e os filhotes das ratas do grupo controle atuando como grupo controle. Os animais foram anestesiados utilizando-se uma associação de Xilazina e Quetamina (Cetamina) e foram submetidos à eutanásia por punção cardíaca, em fase de estro, para coleta dos pulmões. Coleta do sangue realizada através de punção cardíaca. Para que os pulmões mantivessem sua arquitetura morfológica

e pressão constante (20 cmH₂O) foi introduzida, na região da traqueia, formalina tamponada 10%.

O tecido pulmonar foi coletado aleatoriamente de áreas centrais brônquios e bronquíolos e periféricas dos pulmões de cada animal para o processamento e confecção dos blocos em parafina.

2.4 Análise histopatológica

A preparação das lâminas histológicas foi realizada através de cortes de 5µm das amostras, colocando dois cortes idênticos por lâmina e quando possível três. As lâminas foram cegadas, de modo que os resultados da etapa das fotografias histopatológicas realizadas das lâminas para análise não fossem prejudicados ou influenciados pelos avaliadores. As lâminas foram coradas com três diferentes colorações: Hematoxilina e Eosina (HE) e Toluidina. Foram realizadas 32 lâminas de cada coloração para análise.

A coloração Hematoxilina e Eosina foi utilizada para realização da seleção das vias aéreas mais apropriadas para avaliação morfológica e do infiltrado inflamatório, com inclusão no estudo das lâminas das vias aéreas localizadas em região distal do pulmão e com preservação da arquitetura histológica. A análise dos mastócitos foi realizada com a coloração do corante Toluidina.

Foram fotografadas as lâminas preparadas, através de um microscópio de luz eletrônico em uso do programa LAS 2.4 e utilizou-se as configurações padronizadas de Brilho em 55%, saturação em 100,00 e Gamma a 0,10. A escala de medida foi padronizada de 50µm em todas as fotografias histopatológicas. A cada foto tirada, nomeou-se utilizando a padronização: Nome da lâmina (de acordo com a técnica de cegamento proposta) seguido do número da foto e seguido do aumento utilizado de acordo com a análise (10X ou 20X).

Nas lâminas coradas com HE, fotografou-se 5 campos alveolares de forma aleatória utilizando as objetivas de aumento de 20 vezes como padrão para avaliação e mensuração de infiltrado inflamatório através da análise morfológica.

A mensuração do infiltrado inflamatório foi realizada por meio do método semi-quantitativo proposto por Carnieli et al. (2011)¹⁷, sistema o qual classifica o infiltrado inflamatório em score de 0 a 3, sendo: 0 (Sem alterações, normalidade);

1 (áreas de inflamação ocasionais, pouca inflamação); 2 (inflamação em maioria das áreas, cercadas por uma camada fina de células, moderada inflamação) e 3 (maioria das áreas inflamadas circundadas por uma camada grossa de células, acentuada inflamação). Através a mensuração de proliferação celular quando há visível alteração morfológica (espessamento) nos campos alveolares.

Nas lâminas coradas com Toluidina, fotografou-se as vias aéreas principais: Brônquios e Bronquíolos, utilizando as objetivas de aumento de 10x e 20x, no mesmo microscópio referido, com medida padronizada de 50 μ m, as quais foram fotografadas de forma aleatória, considerando somente um único quesito: Haver uma boa visualização da via aérea (boa definição e sem alteração do corte) para posterior análise histopatológica do corte. As imagens foram armazenadas para posterior análise.

A análise dos mastócitos, com o corante toluidina, foi realizada por meio do mesmo software analisador de imagens Image Pro Plus (Versão 4.5.0.29 para Windows) com a realização também da relação da quantidade de células encontradas (reagentes – mastócitos) sobre a área.

Os dados recolhidos na graduação das lâminas com coloração HE e Toluidina foram manejados através do software Excell (2019) do Microsoft Office para realização da relação Células-Área e graduação do infiltrado inflamatório.

2.5 Análise estatística

Para a análise estatística na qual será utilizado o programa Sigma Stat® versão 2.0, através dos dados adquiridos e manejados com o Excell (2019). Nesse passo, serão descegadas as lâminas dos grupos Mix 100x (T) e controle (C), para comparação e realização da estatística. Os casos em que os dados apresentaram as distribuições normais, foi aplicado o teste T-student para averiguação da significância. As diferenças serão consideradas estatisticamente significantes quando p for menor que 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

Com relação a comparação entre os scores de inflamação, não foi verificada alterações (Tabela 2). O Grupo controle, no qual $n=12$ (37,5%), houve uma média de 1,0 no score de inflamação com intervalo de 25%-75% de 1,0 a 3,0. Enquanto no grupo Mix 100x (tratado), no qual $n=20$ (62,5%), houve uma

média de 2,0 no score de inflamação com intervalo de 25%-75% de 1,0 a 2,0. (p=0,770)

Tabela 2. Comparação entre os scores de inflamação (de acordo com a mensuração do infiltrado inflamatório realizada por meio do método semi-quantitativo proposto por Carnieli et al. (2011)¹⁷) dos grupos controle e submetidos à mistura de Disruptores Endócrinos (Mix 100x).

Grupos	n (%)	Med (25%-75%)
Controle	12,0 (37,5)	1,0 (1,0 – 3,0)
Mix 100x (DE)	20,0 (62,5)	2,0 (1,0 – 2,0)
Total	32 (100,0)	

*DE: Disruptores Endócrinos; p=0,770

A figura 1 mostra a comparação da média (%) da relação da quantidade de células encontradas sobre a área das vias aéreas. O Grupo Controle, no qual n=25 (41%), houve uma média de 35,24% na relação Cél./Área, com desvio padrão de 21,24%. Enquanto no grupo Mix 100x (tratado), no qual n=36 (59%), houve uma média de 52% na relação Cél./Área, com desvio padrão de 38,6253%. (p=0,047)

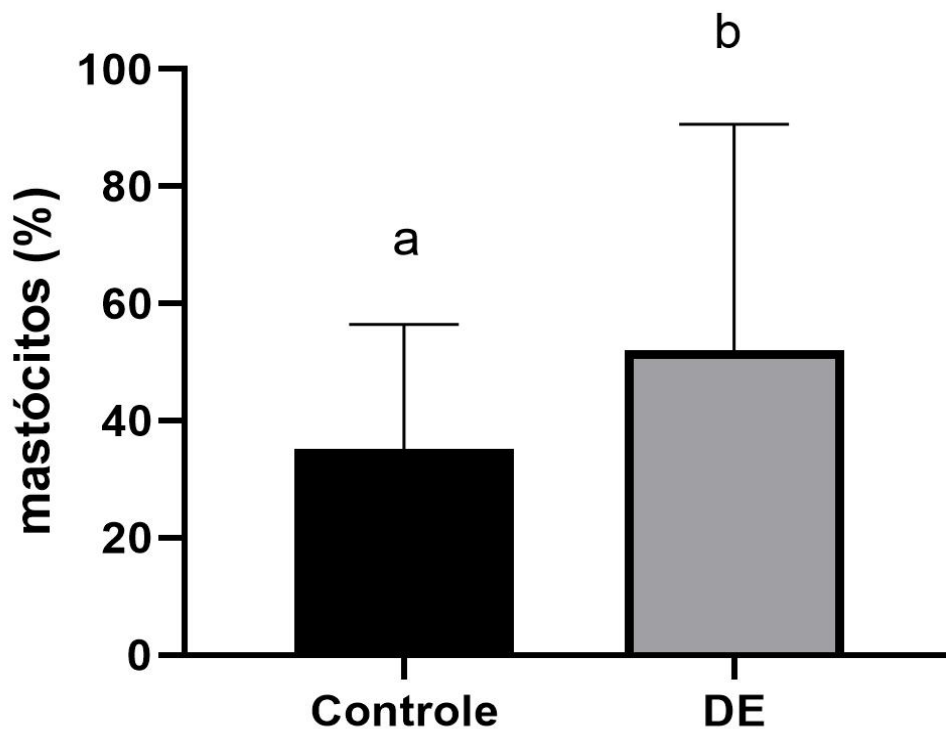


Figura 1. Comparação da média (%) da relação da quantidade de células encontradas (reagentes – mastócitos) sobre a área (Cél./Área) das vias aéreas principais Brônquios e Bronquíolos analisadas. ($p=0,047$)

4 DISCUSSÃO

O presente estudo, apresentou resultados importantes ao comprovarem a hipótese inicial de que uma mistura de DE baseada na exposição humana ao longo da vida é capaz de alterar as células do pulmão, podendo comprometer as funções deste órgão.

Rehman e colaboradores¹⁸, ao administrarem BPA em ratos nas doses de 10 mg/kg a 25 mg/kg por 6-12 semanas, constataram um aumento expressivo no número de mastócitos nos alvéolos e bronquíolos, resultando em danos pulmonares significativos. Este achado alinha-se com os resultados do nosso estudo, no qual a exposição à mistura de DE também resultou em um aumento no número de mastócitos.

Os mastócitos desempenham papel fundamental na resposta asmática ao secretar uma variedade de mediadores com efeitos pró-inflamatórios e de constrição das vias aéreas¹⁰. DEP e DEHP, ftalatos de uso industrial que

proporciona aumento da flexibilidade aos plásticos, apresentaram uma associação positiva envolvendo problemas respiratórios, como asma e rinite¹⁹. Além disso, as células mastocitárias seria um componente crucial do microambiente imunológico tumoral, modulando a progressão neoplásica ao secretar uma variedade de fatores pró e antitumorais²⁰.

Tais estudos, juntamente com nossos dados, suportam a hipótese de que tóxicos ambientais são deletérios, através do aumento de mastócitos, que levam à progressão do dano pulmonar.

Camundongos expostos por 28 dias à vinclozolin, um fungicida, administrado oralmente em uma dose de 100 mg/kg, induziu alterações histológicas e deposições de colágeno nos pulmões. Além disso, provocou inflamação e estresse oxidativo que resultaram em apoptose pulmonar²¹. Este estudo demonstra que os efeitos toxicológicos à vinclozolin não se limitam ao sistema reprodutivo, envolvendo também os pulmões.

Outro achado em nosso estudo, foi de que não houve alterações significativas em relação ao score de inflamação. Este resultado vai contrário ao de Abedelhaffez e colaboradores²², após submeter ratos a dose de 500mg/kg de BPA por 30 dias, observaram infiltrações celulares e alterações inflamatórias fibrosas após a administração de BPA, podendo promover o desenvolvimento de doenças pulmonares inflamatórias com possível indução de fibrose pulmonar. A utilização de doses baixas pode ser um fator que não tenha estimulado a inflamação em nosso estudo.

A exposição ao BPA está associada a uma resposta inflamatória crônica intensificada, estresse oxidativo induzido, danos ao DNA e infiltração fibrosa de muitos órgãos de maneira dependente do tempo²¹. No estudo de Landrigan e colaboradores¹⁹, demonstra que a exposição a plásticos tem o potencial de desencadear respostas imunes prejudiciais nos tecidos pulmonares. A presença de inflamação crônica nos pulmões, uma característica central em diversas doenças respiratórias, como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), ressalta a necessidade de atenção cautelosa ao uso desses compostos. Esses resultados fornecem um alerta relevante sobre os possíveis impactos na saúde da população em geral decorrentes da exposição a esses materiais.

No cenário da saúde pública, este estudo propõe uma análise mais

detalhada dos efeitos do ambiente ao longo da vida na histopatologia pulmonar. Investigar esta relação é fundamental, no qual não apenas contribuem para o entendimento da toxicidade desses compostos, mas também ressaltam a necessidade de regulamentações mais rigorosas e estratégias de prevenção para proteger a saúde respiratória em ambientes, uma vez que o câncer de pulmão é atualmente a principal causa de mortalidade por câncer, representando aproximadamente 20%²³. Essa abordagem oferece novas perspectivas para pesquisas relacionadas a exposições ambientais múltiplas, proporcionando uma compreensão mais abrangente dos impactos potenciais na saúde pulmonar.

5 CONCLUSÃO

Assim, podemos concluir que a exposição a uma mistura de DE ao longo da vida promove alterações na quantificação de mastócitos. Esses achados sugerem que os DE podem causar alterações celular e conseqüentemente funcionais em pulmões. Destacando que a sua ingestão é capaz de provocar toxicidade pulmonar.

6 CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflito de interesse para ser declarado.

REFERÊNCIAS

1. Américo J, Messias T, Torres N, Américo G. Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 2012;22. doi: <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v22i1.30795>
2. Koifman S, Paumgartten FJR. O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*. 2002;18(2):354–5. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2002000200001>

3. Guarnotta V, Amodei R, Frasca F, Aversa A, Giordano C. Impact of Chemical Endocrine Disruptors and Hormone Modulators on the Endocrine System. *Int J Mol Sci*. 2022 May 20;23(10):5710. doi: 10.3390/ijms23105710
4. Beserra M, Schiavini J, Rodrigues W, Pereira C. O Bisfenol A: sua utilização e a atual polêmica em relação aos possíveis danos à saúde humana. *Rev Eletr TECCEN*. 2016 Nov;5(1):37. doi: 10.21727/teccen.v5i1.478.
5. Carou ME, Deguiz ML, Reynoso R, Szwarcfarb B, Carbone S, Moguilevsky JA, et al. Impact of the UV-B filter 4-(Methylbenzylidene)-camphor (4-MBC) during prenatal development in the neuroendocrine regulation of gonadal axis in male and female adult rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;27(3):410–4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.01.007>
6. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. *Anatomia orientada para clínica*. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018.
7. Liang N, Song W, Li J. BPA promotes lung fibrosis in mice by regulating autophagy-dependent ferroptosis in alveolar epithelial cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2024 Jun 15;278:116412. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.116412.
8. Vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect*. 2005;113(8):926–33. doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.7713>
9. Schiavetto CB, Crisci AR, Malfará WR. Alterações morfológicas e morfométricas induzidas por di (2-etil) ftalato (DEHP) em pulmão e fígado de ratos Wistar. *Rev Bras Multidiscip*. 2016;19(2):72–82. doi: <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2016.v19i2.414>
10. Méndez-Enríquez E, Hallgren J. Mast cells and their progenitors in allergic asthma. *Front Immunol*. 2019;10:821. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00821>

11. Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, et al. Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J Androl*. 2012;35(3):303–16. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01242.x>
12. Kahn LG, Philippat C, Nakayama SF, Slama R, Trasande L. Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(8):703–18. doi: [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30129-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30129-7)
13. Coelho AM, Queiroz IF, Lima WG, et al. Temporal analysis of paracetamol-induced hepatotoxicity. *Drug Chem Toxicol*. 2023;46(3):472-81. doi:10.1080/01480545.2022.2052891
14. Zhong Y, Chen Y, Pan Z, et al. Ginsenoside R_c, as an FXR activator, alleviates acetaminophen-induced hepatotoxicity via relieving inflammation and oxidative stress. *Front Pharmacol*. 2022; 13:1027731 doi:10.3389/fphar.2022.1027731
15. Axelstad M, Christiansen S, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, Isling LK, et al. Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reproduction*. 2014;147(4):489–501. doi: <https://doi.org/10.1530/REP-13-0447>
16. Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, Mandrup KR, Axelstad M, Christiansen S, et al. Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters. *Reproduction*. 2014;147(4):465–76. doi: <https://doi.org/10.1530/REP-13-0448>
17. Carnieli DS, Yoshioka E, Silva LF, Lanças T, Arantes FM, Perini A, et al. Inflammation and remodeling in infantile, juvenile, and adult allergic sensitized mice. *Pediatr Pulmonol*. 2011;46(7):650–65. doi: <https://doi.org/10.1002/ppul.21436>

18. Rehman A, Akhtar T, Hameed N, Sheikh N. In vivo assessment of bisphenol A induced histopathological alterations and inflammatory gene expression in lungs of male Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*. 2021;40(3):538–49. doi: <https://doi.org/10.1177/0960327120958459>
19. Landrigan PJ, Raps H, Cropper M, Bald C, Brunner M, Canonizado EM, et al. The Minderoo-Monaco Commission on Plastics and Human Health. *Ann Glob Health*. 2023;89(1):23. doi: <https://doi.org/10.5334/aogh.4056>
20. Zhang P, Liu J, Pei S, Wu D, Xie J, Liu J, et al. Mast cell marker gene signature: prognosis and immunotherapy response prediction in lung adenocarcinoma through integrated scRNA-seq and bulk RNA-seq. *Front Immunol*. 2023;14:1189520. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1189520>
21. D'Amico R, Di Paola D, Impellizzeri D, Genovese T, Fusco R, Peritore AF, et al. Chronic exposure to endocrine disruptor vinclozolin leads to lung damage via Nrf2-NF- κ B pathway alterations. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11320. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms231911320>
22. Abedelhaffez AS, El-Aziz EAA, Aziz MAA, Ahmed AM. Lung injury induced by bisphenol A: a food contaminant, is ameliorated by selenium supplementation. *Pathophysiology*. 2017;24(2):81–9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.02.00323>.
23. Oliver AL. Lung cancer: epidemiology and screening. *Surg Clin North Am*. 2022 Jun;102(3):335-44. doi: 10.1016/j.suc.2021.12.001

ANEXOS

Normas Revista Medicina (Ribeirao Preto):

INSTRUÇÕES GERAIS

REQUISITOS DE AUTORIA

Recomendamos que os autores atendam os critérios de autoria estabelecidos pelo ICMJE:

- 1- Contribuição substancial no esboço do estudo ou na interpretação dos dados;
- 2- Participação na redação da versão preliminar;
- 3- Participação na revisão e aprovação da versão final;
- 4- Conformidade em ser responsável pela exatidão ou integridade de qualquer parte do estudo.

Os Editores da revista Medicina (Ribeirão Preto) não se responsabilizarão em determinar quem se qualifica ou não para ser autor e também não realizarão arbitragem de conflitos de autoria.

O autor correspondente assumirá a responsabilidade principal de comunicação com a revista, sendo importante que o mesmo esteja disponível durante a revisão por pares, edição e publicação para responder aos questionamentos editoriais em tempo hábil.

Recomenda-se que o último autor seja o coordenador do estudo e/ou líder do grupo de pesquisa.

A seção de agradecimentos, descrita na folha de rosto, poderá ser utilizada para prestigiar indivíduos que não atendam aos critérios de autoria acima, mas que tenham contribuído com o estudo. (Vide QUADRO RESUMO pg.14)

1.1 IDENTIFICAÇÃO DO AUTOR (ORCID ID)

Incentivamos todos os autores a se registrarem e utilizarem o ORCID ID (identificador digital persistente para o autor) que distingue um autor de qualquer outro, ainda que tenha homônimo ou que tenha sido citado e/ou indexado de variadas formas .

1.2 DIREITOS AUTORAIS

Ao assinarem a declaração de responsabilidade e direitos autorais os autores afirmam a participação suficiente de todos na realização do trabalho e assumem, publicamente, que são responsáveis por seu conteúdo.

A revista Medicina (Ribeirão Preto) adota política de acesso aberto e a licença Creative Commons CC-BY, portanto os textos estão disponíveis para cópia e redistribuição em qualquer meio ou formato com a devida citação da fonte e autoria. Assim, não é necessária permissão por parte dos autores ou editores.

1.3 PROCESSO DE AVALIAÇÃO

Todos os processos de revisão da Revista Medicina (Ribeirão Preto) são duplo-cegos e revisados por pares. A seleção dos trabalhos para publicação é composta por duas fases: na primeira, a Comissão de Publicação analisa o interesse do tema para o público-alvo da revista e se o manuscrito está de acordo com as normas de publicação.

1.3.1 REENVIO DE ARTIGOS

O manuscrito revisado, contendo as modificações destacadas com marca- texto ou em outra cor, deverá ser enviado pela guia "Revisões" da plataforma de submissão da revista Medicina (Ribeirão Preto), acompanhado de uma "carta-resposta" que inclua uma lista detalhada, ponto a ponto, de como os comentários de cada um dos revisores foram abordados.

1.4 TAXAS DE PUBLICAÇÃO

Não são cobradas taxas para submissão e processamento dos artigos, exceto para a publicação de anais de congressos, conforme descrito adiante.

1.4.1 TRADUÇÃO PARA LÍNGUA INGLESA

Visando a internacionalização da revista, a partir de Janeiro de 2021 todos os artigos submetidos em língua portuguesa ou espanhola, caso aprovados para publicação na Revista Medicina (Ribeirão Preto), serão publicados também em língua inglesa. A tradução para o inglês é de inteira responsabilidade dos autores. Recomenda-se que a tradução seja feita por um profissional especializado, pois a revista se reserva o direito de devolver o manuscrito para correção caso o julgue mal traduzido.

1.5 POLÍTICA DE PREVENÇÃO AO PLÁGIO EM PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

A revista Medicina (Ribeirão Preto) publica exclusivamente material original, ou seja, material que não foi publicado e nem está em revisão em outro periódico.

Para detectar ocorrências de texto similar em manuscritos submetidos para publicação, são usados softwares específicos para prevenção de plágio.

Quando houver suspeita de plágio, o artigo poderá ser rejeitado para revisão ou publicação conforme julgamento pelos editores. Alternativamente, autores poderão ser convidados a prestar esclarecimentos, havendo a possibilidade de correção do texto com nova redação.

A reprodução de trechos ou da integralidade de outros artigos sem dar o

devido crédito à fonte é inaceitável, bem como a produção de muitos artigos com quase o mesmo conteúdo pelos mesmos autores. O autoplágio ocorre quando autores escrevem vários manuscritos em periódicos diferentes que foram modificados apenas ligeiramente, o que não é considerado ético.

Se o plágio for detectado após a publicação, o conselho editorial poderá solicitar uma retratação pelos autores, emitir uma correção ou retirar o artigo. Pesquisadores não podem apresentar resultados obtidos por terceiros como se os tivessem produzido e devem reconhecer o trabalho de outros usado em suas pesquisas, citando-as e descrevendo como influenciaram a direção e o curso de seu estudo.

1.6 PERIODICIDADE

A revista Medicina (Ribeirão Preto) é uma revista eletrônica com publicação trimestral. A partir de Janeiro de 2021 o sistema de publicação será em fluxo contínuo (rolling pass).

2. CATEGORIA DOS MANUSCRITOS

2.1 ARTIGO ORIGINAL

São artigos nos quais são informados os resultados obtidos em pesquisas originais, utilizando abordagens quantitativas ou qualitativas de interesse geral para área da saúde. Deverão conter as seções: “Introdução, Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão” que poderão, algumas vezes, necessitar de subtítulos dentro dessas seções para melhor organizar o conteúdo.

Os artigos originais devem ser enviados juntos a uma carta de apresentação.

Ensaio clínico deve seguir a diretriz CONSORT e estudos observacionais devem seguir a diretriz de redação STROBE que são preenchidas e enviadas em conjunto com o artigo.

Introdução

Fornecer um contexto e os conceitos essenciais ao projeto, assim como declarar o propósito específico ou o objetivo da investigação, a lacuna do conhecimento que se pretende preencher, ou a hipótese a ser testada pela pesquisa.

Sugerimos a restrição às citações de referências diretas, sem incluir dados ou conclusões do estudo que está sendo relatado.

Sugerimos de 3 a 5 parágrafos na introdução com a explicitação dos objetivos ao final.

a) Métodos

Parte do manuscrito que permite que as pessoas que acessam os dados sejam capazes de reproduzir os resultados. O princípio orientador da seção de métodos deve ser clareza sobre como e por que o estudo foi investigado daquela maneira em particular. A seção de métodos pode ser subdividida e detalhada para facilitar a compreensão.

Nesta seção, deve-se incluir uma declaração para informar que a pesquisa foi aprovada ou foi isentada de apreciação pelo comitê de ética responsável.

b) Resultados

Os resultados deverão ser apresentados em sequência lógica no texto, nas tabelas e figuras. Restringir tabelas e figuras àquelas informações necessárias para explicar o argumento do artigo e como dados de apoio. Usar gráficos como alternativa a tabelas com muitos dados. Não duplicar os dados em gráficos e tabelas. Não repetir informações dos gráficos e tabelas no texto.

c) Discussão

Os resultados deverão ser apresentados em sequência lógica no texto, nas tabelas e figuras. Restringir tabelas e figuras àquelas

informações necessárias para explicar o argumento do artigo e como dados de apoio. Usar gráficos como alternativa a tabelas com muitos dados. Não duplicar os dados em gráficos e tabelas. Não repetir

informações dos gráficos e tabelas no texto.

d) Conclusão

Essa sessão deve responder de forma objetiva às formulações dos objetivos.

2.2 ARTIGO DE REVISÃO

Trata-se de artigos de revisão crítica da literatura sobre um tema ou problema específico. Somente serão aceitas as revisões sistemáticas e metanálise. As

submissões para esta seção deverão ser feitas seguindo a diretriz PRISMA e o checklist comentado deve ser enviado junto com o texto.

Espera-se que os artigos de revisão sejam de autoria de pessoas com reconhecida experiência na área de estudo, a fim de garantir que a revisão crítica da literatura esteja instrumentalizada pela experiência real na questão formulada. Qualquer outro tipo de texto de revisão somente será publicado a convite dos editores.

2.3 RELATO DE CASO

As submissões para esta seção deverão ser feitas seguindo a diretriz CARE.

Deve-se inicialmente apresentar o caso, descrever os procedimentos diagnósticos e apresentar as imagens relativas a exames complementares histopatológicos ou de imagem.

Os autores devem enfatizar os aspectos inovadores ou inusitados do caso, que o diferenciam de alguma forma e justificam sua publicação, como nos exemplos a seguir:

1. Apresentação clínica incomum de uma doença comum que tenha dificultado o seu diagnóstico;
2. Doença rara na qual o diagnóstico diferencial deve ser apontado;
3. Doença comum de tratamento ainda não consolidado.

A CONEP deliberou documento obrigando a presença de TCLE previamente aprovado para relato de caso. Nos casos de óbito, mesmo assim deverá ser aprovado pelo CEP tal pedido solicitando formalmente dispensa do TCLE.

2.4 ENSAIOS

Estes textos têm formato livre, sendo sempre recomendável a apresentação inicial de conceitos na introdução e a delimitação dos objetivos a fim de guiar o interesse do leitor. A exploração do tema pode ser organizada na forma que parecer mais adequada para o autor, e é recomendável que seja encerrada com conclusões ou considerações finais.

2.5 TEMAS DE ENSINO EM SAÚDE

Estes textos têm formato livre, sendo sempre recomendável a apresentação inicial de conceitos na Introdução e a delimitação dos Objetivos a fim de guiar o interesse do leitor. A exploração do tema pode ser organizada na forma que

parecer mais adequada para o autor, e é recomendável que seja encerrada com conclusões ou considerações finais.

Quando estes artigos envolverem algum tipo de experimentação, deverão ser organizados segundo a estrutura descrita para os artigos originais.

2.6 GESTÃO EM ORGANIZAÇÕES DE SAÚDE

Estes textos têm formato livre, sendo sempre recomendável a apresentação inicial de conceitos na Introdução e a delimitação dos Objetivos a fim de guiar o interesse do leitor. A exploração do tema pode ser organizada na forma que parecer mais adequada para o autor, e é recomendável que seja encerrada com conclusões ou considerações finais.

Quando estes artigos envolverem algum tipo de experimentação, deverão ser organizados segundo a estrutura descrita para os artigos originais.

2.7 SUPLEMENTOS

Os suplementos são fascículos de uma revista com temáticas específicas. Em geral estão relacionados a eventos (também chamados „anais de eventos“) ou versam sobre um assunto específico, selecionado a partir de uma proposta dos editores ou dos próprios autores, sendo chamados „suplementos temáticos“.

Enquanto a publicação da revista Medicina (Ribeirão Preto) ocorria de forma impressa, os suplementos temáticos serviam como verdadeiros livros ou manuais do assunto selecionado, assim era muito conveniente que todos os artigos estivessem no mesmo fascículo. Todavia, com a migração da publicação da revista exclusivamente para o meio eletrônico e o final dos fascículos para

Os anais de congresso podem ser publicados na revista Medicina (Ribeirão Preto) quando os eventos estiverem diretamente relacionados à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP ou ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, contando com docentes em seus quadros organizadores e comissões científicas. Para a publicação de resumos de trabalhos científicos apresentados em eventos, será cobrada uma taxa, relacionada às despesas de revisão dos textos e preparo editorial.

3. SEÇÕES DO MANUSCRITO

Apresentamos abaixo os requisitos gerais para todos os tipos de manuscritos a serem submetidos à revista Medicina (Ribeirão Preto).

3.1 FOLHA DE ROSTO/PÁGINA INICIAL

Incluir os itens abaixo:

- a. Título do artigo no idioma da submissão e em língua inglesa – sucintos, chamativos e representativos do conteúdo do manuscrito (não há um limite rígido para o tamanho do título);
- b. Título abreviado/resumido no idioma da submissão (limitado a até 50 caracteres incluindo letras e espaços);
- c. Nome completo dos autores, separados por vírgula, na ordem em que devem aparecer na versão final, com indicação de afiliação por meio de número sobrescrito;
- d. Afiliação (Instituição, cidade, estado, país) dos autores, precedidos de números sobrescritos correspondentes;

Ex: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Pediatria, Ribeirão Preto, SP, Brasil;

- e. Titulação (título máximo de pós-graduação, atividade profissional e/ou acadêmica relevante) e URL completa do registro no ORCID iD;

- a. Indicação sobre as contribuições específicas de cada autor para o trabalho submetido, inserindo as iniciais dos autores envolvidos em cada uma das tarefas listadas, Conforme descrito em REQUISITOS DE AUTORIA

- b. Informar as fontes de apoio ou financiamento que tenham contribuído para o desenvolvimento do trabalho;

- c. Na seção de agradecimentos incluir os “não autores” Informando abaixo do seu(s) nome(s) uma breve descrição das contribuições específicas à pesquisa.

Observação: Será considerado para indexação o vínculo profissional mais forte para autores com mais de uma afiliação institucional.

1.1 RESUMOS

Os autores precisam garantir que o resumo represente com precisão o conteúdo do texto.

Artigos originais, revisões sistemáticas e metanálises requerem resumos estruturados (objetivos, métodos, resultados e conclusões); ensaios clínicos incluirão os itens que o grupo CONSORT identifica como essencial. Relatos de

caso requerem resumos “não-estruturados”, que descrevem de forma sucinta e objetiva o artigo, sua importância clínica, desfechos e conclusão sumária em um único parágrafo. Recomendamos o limite de até 400 palavras no resumo.

1.2 PALAVRAS-CHAVE / DESCRITORES

Incluir, após o resumo e abstract, entre 3 e 5 palavras-chave e keywords separadas por ponto e vírgula. Os descritores deverão ser obtidos, obrigatoriamente, no vocabulário DeCS e/ou MeSH.

1.3 TEXTO (PADRONIZAÇÃO)

O texto de um manuscrito só pode ser aceito como um arquivo do Microsoft Word criado com o MS Word como um documento "doc" "docx" ou "rtf".

No arquivo da versão a ser submetida use de preferência a fonte Arial, tamanho 12 com espaçamento simples; inclua o título, resumo e palavras-chave (no idioma da submissão e em língua inglesa), texto (estruturado conforme a categoria do manuscrito contendo as tabelas e figuras) e referências.

Observar os quantitativos de palavras recomendadas do texto principal no quadro de resumo.

1.1 TABELAS

As tabelas capturam informações de maneira concisa e as exibem eficientemente e não deverão conter dados previamente informados no texto. Sugerimos limitar o número máximo de tabelas conforme o quadro de resumo. São inseridas no texto principal, numerando-as sequencialmente, juntamente com seus títulos e enviadas no Word (.doc) ou Excel (.xls), não como uma imagem. O título da tabela deve ser claro, explicativo e deve ser colocado acima da mesma, no canto superior esquerdo, logo após a palavra "Tabela" acompanhada de sua numeração (Tabela 1, Tabela 2, etc).

Os marcadores (*, †, ‡, §, //, ¶, #, **, ††, etc) são indicados no rodapé da tabela.

Linhas verticais e diagonais não devem ser usadas em tabelas; em vez disso, recuo e espaço vertical ou horizontal devem ser usados para agrupar dados.

1.2 FIGURAS (FOTOGRAFIA, GRÁFICO, IMAGEM ENTRE OUTROS)

As Figuras incluem ilustrações, imagens, esquemas ou qualquer outro elemento gráfico que não seja uma tabela e devem ser numeradas de forma sequencial com chamadas no texto. Sugerimos limitar o número máximo de figuras conforme o quadro de resumo.

O título da figura deve fornecer explicação de maneira concisa de forma que o leitor compreenda do que se trata sem necessidade de se remeter ao texto. As legendas acrescentam informações sobre aspectos das figuras que necessitem detalhamento.

Observe que não deve haver título na parte superior da figura. É de responsabilidade do(s) autor(es) obter permissão do detentor dos direitos autorais para reproduzir figuras (ou tabelas) que foram publicadas anteriormente em outros lugares. Se forem usadas fotografias de pessoas, os sujeitos não devem ser identificáveis ou suas fotografias devem estar acompanhadas por consentimento escrito.

Utilizar figuras em alta resolução (mínimo de 300 dpi), nos formatos JPG, GIF ou TIFF. Caso sejam enviadas figuras com resolução inadequada, os autores serão convidados a substituí-la por outra de melhor qualidade.

1.3 ABREVIÇÕES E NOMENCLATURAS

Quando se mencionar pela primeira vez um termo a ser abreviado, deve-se descrevê-lo inteiramente e a seguir escrever a abreviação apropriada entre parênteses. Não use abreviações no título e limite seu uso no resumo e no texto.

Encorajamos o uso de unidades do sistema internacional de medidas (SI): s por segundo; min por minuto; h por hora; L por litro; m por metro; nomes de espécies (por exemplo, *Homo sapiens*), genes, mutações, genótipos e alelos devem estar em itálico.

As medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser relatadas em unidades métricas (metro, quilograma ou litro) ou em seus múltiplos decimais.

1.4 REFERÊNCIAS

Os autores devem fornecer referências diretas de fontes originais de pesquisas sempre que possível. Listas menores de trabalhos “originais-chave” muitas vezes servem tão bem quanto listas mais exaustivas de referências.

As citações ao longo do texto são feitas por números em sobrescrito antes da pontuação, sem espaços:

De acordo com Moura¹⁵, o índice de vacinação...

...de forma significativa¹. (detalhe importante: observar que o ponto é inserido após a citação).

...foi descrita considerando alérgenos inalados²², na ocasião... (a vírgula deverá ser inserida após a citação).

Se duas ou mais referências forem citadas em sequência, apenas a primeira e a última devem ser digitadas, separadas por um traço (exemplo:7-11).

As referências ficam organizadas de acordo com a ordem em que são citadas no texto e padronizadas no estilo Vancouver.

Sugerimos limitar o número máximo de referências conforme o quadro de resumo

1.1 QUADRO RESUMO

Tipo de artigo	Nº de autores	Título (nº max. Caracteres)	Resumo (nº máximo de palavras)	Texto principal (nº máximo de palavras)	Nº de tabelas / figuras	Referências
Artigo original	8	Sem limite	400	7000	8	40
Artigo de revisão	6	Sem limite	400	7000	8	80
Relato de caso	6	Sem limite	400	3000	6	20
Demais categorias	6	Sem limite	400	7000	10	50