

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE
CASCAVEL CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE –
MESTRADO

CAROLINA SCHMITT WALKER

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE ÓSSEA DA MANDÍBULA DE RATOS
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO PRÉ E PÓS-NATAL A RESÍDUOS
ORGANOCLOREDOS DDT E SEUS DERIVADOS**

CASCAVEL-PR
(03/2025)

CAROLINA SCHMITT WALKER

**AVALIAÇÃO DA DENSIDADE ÓSSEA DA MANDÍBULA DE RATOS
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO PRÉ E PÓS-NATAL A RESÍDUOS
ORGANOCLORADOS DDT E SEUS DERIVADOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Saúde –
Mestrado, do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde,
da Universidade Estadual do
Oeste do Paraná, como
requisito para obtenção do título
de Mestre em Biociências e
Saúde.

Área de concentração: Biologia, fatores
que influenciam a morfologia humana.

ORIENTADOR: Sandra Lucinei
Balbo

CASCADEL-PR
(03/2025)

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Documento assinado digitalmente
 CAROLINA SCHMITT WALKER
Data: 06/05/2025 20:03:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura: _____

Data: 12/03/2025

O presente estudo foi realizado com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES- Brasil), código de financiamento 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ- Brasil) 304169/2020-0 e o Global Challenge Research Fund JA1910RD12.

SCHMITT WALKER, CAROLINA

AVALIAÇÃO DA DENSIDADE ÓSSEA DA MANDÍBULA DE RATOS
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO PRÉ E PÓS-NATAL A RESÍDUOS
ORGANOCORADOS DDT E SEUS DERIVADOS / CAROLINA SCHMITT
WALKER; orientador SANDRA LUCINEI BALBO. -- Cascavel, 2025.
94 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
BioCiências e Saúde, 2025.

1. resíduos organoclorados. 2. densidade óssea. 3. DDT. 4.
mandíbula. I. BALBO, SANDRA LUCINEI, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Carolina Schmitt Walker

Título: Avaliação da densidade óssea da mandíbula de ratos submetidos à exposição pré e pós-natal a resíduos organoclorados DDT e seus derivados.

Dissertação/ Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Cascavel, PR para obtenção do título de Mestre, do Programa de Pós-graduação Biociências e Saúde.

Aprovado em: 12/03/2025

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof (a). Dr. Sandra Lucinei Balbo

Instituição: UNIOESTE

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
 SANDRA LUCINEI BALBO
Data: 12/05/2025 11:07:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. Rose Meire Costa

Instituição: UNIOESTE

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
 ROSE MEIRE COSTA
Data: 12/05/2025 09:35:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. Jean Franciesco Vettorazzi

Instituição: UNILA

Assinatura:

Documento assinado digitalmente
 JEAN FRANCIESCO VETTORAZZI
Data: 12/05/2025 09:27:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio incondicional ao longo desta jornada. Aos meus pais, por serem minha base, pelo amor, incentivo e por me ensinarem o valor da dedicação e do conhecimento.

Ao meu marido, **André**, pelo companheirismo, paciência e incentivo em todos os momentos. Ao meu filho, **Bernardo**, minha maior inspiração, razão do meu esforço e motivação diária para seguir em frente.

À minha melhor amiga, **Camilla**, pelo apoio, palavras encorajadoras e amizade inestimável, o que tornou essa caminhada mais leve e significativa. Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado nos momentos de desafios e conquistas, oferecendo apoio e motivação.

À minha orientadora, **Sandra Lucinei Balbo**, pela paciência, incentivo e dedicação em compartilhar seu conhecimento, o que tornou possível a realização deste trabalho. A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação e crescimento acadêmico, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional, amor e compreensão ao longo de toda minha trajetória. Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a buscar meus sonhos.

Ao meu marido, André, pelo companheirismo, paciência e por estar ao meu lado em todos os momentos, compartilhando cada desafio e conquista. Ao meu filho, Bernardo, minha maior inspiração, que me motiva a ser melhor a cada dia.

À minha melhor amiga, Camilla, pelo carinho, amizade verdadeira e pelas palavras de incentivo nos momentos de incerteza.

Ao meu aluno, Pedro, pelo auxílio na organização e análise dos dados, o que contribuiu de forma essencial para o desenvolvimento deste trabalho. À minha orientadora, Sandra Lucinei Balbo, pela dedicação, paciência e pelo valioso conhecimento compartilhado, essencial para a realização deste estudo.

Aos meus colegas e amigos que, de alguma forma, contribuíram para meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e ao Programa de Mestrado de Biociências e Saúde, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento científico.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta jornada, minha eterna gratidão.

EPÍGRAFE

"Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes." Isaac Newton

RESUMO

O aumento do uso de agrotóxicos na agricultura, aliado ao longo tempo de decomposição de seus subprodutos, tem gerado uma série de problemas ambientais e de saúde pública. Estudos epidemiológicos recentes forneceram evidências relacionando a exposição pré e pós-natal a agrotóxicos organoclorados com diversos agravos à saúde. Poucos estudos evidenciam a provável relação entre a exposição a baixas doses ao agrotóxico organoclorado DDT (Diclorodifeniltricloroetano) e seus resíduos a alterações mineralógicas e densidade óssea. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a densidade óssea mandibular transgeracional em ratos púberes e adultos, submetidos à exposição pré e pós-natal a baixas concentrações de resíduos organoclorados, especificamente, os derivados do DDT. Após a confirmação da prenhez, as ratas foram divididas em quatro grupos experimentais (n=6 por grupo), durante os períodos de gestação e lactação. Para o grupo controle, foi ofertada água à vontade, enquanto os outros grupos também receberam água à vontade, porém, contendo os seguintes agrotóxicos organoclorados e seus resíduos: ao grupo Diclorodifenildicloroetano (DDD) foi ofertada água de torneira à vontade, na qual foi adicionado DDD (0,0147 μ M; 0,0047 mg/L); ao grupo Diclorodifenildicloroetileno (DDE), foi ofertada água de torneira à vontade, na qual foi adicionado DDE (0,0056 μ M; 0,0018 mg/L). A prole (geração F1) continuou recebendo, durante todo o desenvolvimento, formulações de água com os padrões de resíduos do DDT de acordo com os grupos (Controle, DDD, DDE). Da mesma maneira, originou-se a geração F2 a partir da geração F1. A geração F2 foi submetida à mesma exposição aos resíduos de DDT que a geração F1. As avaliações das gerações F1 e F2 foram realizadas com 35 dias pós-natal (PND35) e 105 dias pós-natal (PND105). Os animais foram submetidos à eutanásia e as mandíbulas coletadas para análise por tomografia computadorizada. A densidade óssea dos animais foi estatisticamente semelhante entre os grupos avaliados (controle, DDD e DDE), nas gerações F1 e F2, para os períodos avaliados (PND35 e PND105). Conclui-se que a exposição pré e pós-natal aos resíduos organoclorados DDT e seus derivados, nas concentrações avaliadas, não causa alterações expressivas na densidade óssea mandibular em ratos nas gerações 1 e 2 e reforça a necessidade de mais estudos para compreender os mecanismos subjacentes e os possíveis efeitos a longo prazo da exposição a

agrotóxicos organoclorados, especialmente, em baixas doses, sobre a saúde óssea e outras condições de saúde.

Palavras-Chave: Pesticidas; densidade óssea mandibular; transgeracional.

ABSTRACT

EVALUATION OF MANDIBULAR BONE DENSITY IN RATS EXPOSED TO ORGANOCHLORINE RESIDUES DDT AND ITS DERIVATIVES DURING PRE- AND POSTNATAL PERIODS

The increased use of pesticides in agriculture, combined with the long degradation time of their byproducts, has led to a range of environmental and public health issues. Recent epidemiological studies have provided evidence linking pre- and postnatal exposure to organochlorine pesticides with various adverse health outcomes. However, few studies have investigated the potential relationship between low-dose exposure to the organochlorine pesticide DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and its residues with mineralogical alterations and changes in bone density. In this context, the objective of the present study was to evaluate transgenerational mandibular bone density in pubertal and adult rats subjected to pre- and postnatal exposure to low concentrations of organochlorine residues, specifically DDT derivatives. Following confirmation of pregnancy, female rats were randomly assigned to four experimental groups (n=6 per group) throughout gestation and lactation. The control group received ad libitum tap water, while the remaining groups also had ad libitum access to water, supplemented with the following organochlorine pesticides and their residues: the DDD group received tap water supplemented with DDD (dichlorodiphenyldichloroethane) at 0.0147 μM (0.0047 mg/L), and the DDE group received tap water supplemented with DDE (dichlorodiphenyldichloroethylene) at 0.0056 μM (0.0018 mg/L). The offspring (F1 generation) continued to receive the respective DDT residue formulations in their drinking water throughout development according to their assigned groups (Control, DDD, DDE). Likewise, the F2 generation was derived from the F1 generation and was subjected to the same DDT residue exposure. Evaluations of both F1 and F2 generations were conducted at 35 postnatal days (PND35) and 105 postnatal days (PND105). Following euthanasia, mandibles were collected and analyzed using computed tomography. Bone density measurements revealed no statistically significant differences among the evaluated groups (Control, DDD, DDE) in either generation (F1 and F2) at the assessed time points (PND35 and PND105). In conclusion, pre- and postnatal exposure to DDT and its derivatives at the evaluated

concentrations did not result in significant alterations in mandibular bone density in first and second generation rats. These findings highlight the need for further studies to elucidate the underlying mechanisms and potential long-term effects of low-dose organochlorine pesticide exposure on bone health and other health outcomes.

Keywords: Pesticides; mandibular bone density; transgenerational.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Localização dos principais reservatórios de DDT em todo o mundo e as concentrações plasmáticas de DDE no tecido adiposo humano descritas por Mansouri.....24

Figura 2 – Delineamento experimental esquematizado. Fonte: Biorender.....42

Figura 3. Orthopantomograph TM OP300, no FOV de 61X48mm, utilizado 90kV, 10mA por 13 segundos, expondo a peça a 1062mGycm² gerando 300 imagens.....44

Figura 4. ICM simboliza o índice cortical mandibular (ICM) utilizados em radiografias panorâmicas. A análise da cortical mandibular que é avaliado a partir de imagens sagitais. É avaliado visualmente, distalmente ao forame mentual, bilateralmente, e classificado segundo a classificação de Klementi. Fonte: Castro, 2016.....44

Figura 5. ECM (Espessura Cortical Mental) representa a espessura cortical mandibular na região do forame mentual, conforme descrito por Ledgerton *et al.*, 1997 e é medido pela espessura da cortical mandibular numa linha perpendicular a duas linhas paralelas que delimitam a cortical mandibular na região do forame mentual. Fonte: Castro, 2016.....45

Figuras 6 e 7. IMP (superior (S) e inferior (I) que simboliza o índice mandibular panorâmico (IMP) utilizados em radiografias panorâmicas, sendo a razão entre a espessura da cortical mandibular e a distância

entre a abertura do forame mental (superior e inferior) e o córtex
mandibular inferior. Fonte: Castro, 2016.....45

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais

CLT – controle

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DDT – diclorodifeniltricloroetano

DDE – diclorodifenildicloroetano

DDD – diclorodifenitricloroetileno

DNA – ácido desoxirribonucleico

DOHaD- Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença

ECM – Espessura Cortical Mental

FOV – Tamanho do campo de visão

Fund LinBio – Laboratório de Investigações Biológicas

GCRF – Global Challenges Research

ICM - Índice Cortical Mandibular

IMC- Índice de Massa Corporal

IMP- Índice Mandibular Panorâmico

kV – Quilovolt

LOAEL – Low Observed Adverse Effect Level

mA - Miliampére

mGycm – Miligray por centímetro

NOAEL- No Observed Adverse Effect Level

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPFRs - Retardadores de chama organofosforados

PBDEs- Éteres difenil polibromados

POP – Poluentes Orgânicos Persistentes

RfD - Dose de Referência

RNA - ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
2.OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1 Agrotóxicos organoclorados e seus resíduos.....	23
3.2 Importância dos estudos a longo prazo com modelos animais na avaliação da toxicidade do DDT e de seus resíduos.....	27
3.3 Estudos multigeracionais na avaliação da toxicidade do DDT e de seus resíduos.....	29
3.4 Epigenética e metabolismo ósseo.....	32
3.4.1 Composição do tecido ósseo.....	33
3.4.2 Tipos de ossos no tecido maduro.....	33
3.4.3 Metabolismo ósseo e remodelação.....	34
3.4.4 Epigenética no metabolismo ósseo.....	34
3.5 Alterações no tecido ósseo detectadas por imagens.....	35
3.6 Efeitos dos agrotóxicos organoclorados e seus resíduos na densidade óssea	35
4. METODOLOGIA.....	40
4.1 Delineamento experimental.....	40
4.2 Formulação de água com concentrações-traço de resíduos do DDT.....	40
4.3 Animais.....	40
4.3.1 Geração parietal.....	41
4.3.2 Gerações descendentes F1 e F2.....	42
4.4 Avaliação das gerações descendentes (F1 e F2).....	43
4.5 Análise estatística.....	46
5. ARTIGO.....	47

6. CONCLUSÕES FINAIS.....	64
7.REFERÊNCIAS.....	69
8. ANEXOS.....	75
8.1 Anexo 1.....	75
8.2 Anexo 2.....	76
8.3 Anexo 3.....	93

1.INTRODUÇÃO

O uso crescente de agrotóxicos tem causado uma série de problemas relacionados à contaminação ambiental, bem como à saúde pública (Al Antary *et al.*,2021; Dutra, Ferreira, 2017). Embora os agrotóxicos sejam desenvolvidos seguindo critérios de segurança, há evidências de que sua exposição está relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurológicas, disfunções reprodutivas, distúrbios metabólicos, alterações esqueléticas, alterações musculares e anomalias congênitas (Kalliora *et al.*,2018; Teodoro *et al.*,2019). Algumas das principais classes desses agrotóxicos foram desenvolvidas a partir dos anos 1930, entre elas, os organoclorados, sendo o Diclorodifeniltricloroetano (DDT) o principal representante dessa classe (Klaassen, 2013). O DDT foi amplamente utilizado no controle de vetores de doenças, como tifo e malária (Ferreira *et al.*, 2020; Klaassen, 2013; Mansouri *et al.*, 2017). No entanto, o uso intensivo desse produto, aliado ao seu longo tempo de meia-vida e ao acúmulo de seus produtos de degradação (Diclorodifenildicloroetano – DDD; Diclorodifenildicloroetileno – DDE), tornou evidente seus efeitos de bioacumulação no ambiente (Ferreira *et al.*,2020; Klaassen, 2013; Mansouri *et al.*,2017). Diversos estudos indicam a presença de DDT e seus resíduos no solo (Fernandes *et al.*,2020; Ssebugere *et al.*,2010; Thiombane *et al.*,2018; Woodrow *et al.*,2018), na água (Carrizo *et al.*,2017) e nos sedimentos (Fernandes *et al.*,2020; Gerber *et al.*,2016; Varnosfaderany *et al.*,2020), como também em animais aquáticos (Ferreira *et al.*,2020) e terrestres (Martínez-López *et al.*,2015) em diferentes regiões do mundo (Mansouri *et al.*,2017). Essas evidências fazem com que o DDT seja classificado como um poluente orgânico persistente de alto risco, proibido na maioria dos países, mas liberado de forma controlada em alguns casos, por exemplo, no controle de vetores de doenças em regiões endêmicas, quando alternativas mais seguras não estão disponíveis (Convenção de Estocolmo, 2018).

Estudos indicam que a exposição ao DDT e seus resíduos induzem efeitos citotóxicos (Pérez-Maldonado *et al.*,2005), nefrotóxicos (Marouani *et al.*,2017), hepatotóxicos (Migliaccio *et al.*,2019), neurotóxicos, como também danos reprodutivos (Marouani *et al.*,2017), distúrbios endócrinos e metabólicos (Pestana *et al.*,2017). Além disso, ao avaliar os dados do Ministério da Saúde, obtidos no Sistema

de Informação de Nascidos Vivos (SINASC, 2022), observa-se que o município de Cascavel-PR, cidade próxima à região de estudo anteriormente citada, ao ser comparado com o número de nascidos com anomalias congênitas ou defeito congênito a cada 1000 nascidos vivos do Estado do Paraná ou do Brasil, apresenta, desde 2007 até 2020, frequências mais elevadas, com proporções até 2,2 vezes superiores ao número de casos observado no Estado.

Por meio de um processo conhecido como destilação global, os agrotóxicos precipitam-se em solo, vegetação e cursos de água, razão pela qual se pode encontrar resíduos de DDT e de seus metabólitos nos locais mais remotos do planeta, por exemplo, em animais marinhos em países da África. Acredita-se que possam, devido à sua alta lipossolubilidade, ficar retidos no organismo de animais marinhos migratórios, sendo, assim, transportados a grandes distâncias, o que, possivelmente, seja a causa das altas concentrações de organoclorados em regiões polares (Beard *et al.*, 2006). Os agrotóxicos, em geral, são absorvidos pelos sedimentos do solo, podendo sofrer percolação, seguida de lixiviação, e posterior contaminação dos lençóis freáticos. A contaminação das águas dos lençóis freáticos possibilita a rápida absorção por microrganismos e vegetais, sendo, posteriormente, acumulados em animais de níveis tróficos superiores (Beard *et al.*, 2006).

A contaminação pelo DDT pode ocorrer no ser humano pela exposição direta, através da inalação, por água ou alimentos contaminados, incluindo o leite (Beard *et al.*, 2006).

Estudos recentes reforçam que a epigenética desempenha um papel crucial na formação óssea e na manutenção da homeostase, sendo influenciada por fatores ambientais, como a exposição a agrotóxicos e reguladores endócrinos. Esses fatores iniciam vias de sinalização intracelular que modulam a expressão gênica no núcleo, o que impacta diretamente o processo de mineralização óssea e a qualidade do tecido ósseo. Por exemplo, evidências mostram que a deficiência de vitamina C pode comprometer a integridade dos tecidos conjuntivos, incluindo os ossos, por meio de alterações epigenéticas. A vitamina C regula epigeneticamente a diferenciação e a função osteogênica ao modular a acessibilidade da cromatina e ativar a atividade transcricional de genes envolvidos na formação óssea (Beard *et al.*, 2000; Bianco-Miotto *et al.*, 2017; Cano-Sancho *et al.*, 2017; Cluett *et al.*, 2019; Kubota *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2024; Malcom, Valcarcel, 2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; ScienceDirect, 2024).

Os agrotóxicos, por sua vez, são conhecidos por atuarem como desreguladores endócrinos, interferindo em processos epigenéticos que regulam hormônios essenciais para a saúde óssea, como o estrogênio e a vitamina D. Esses compostos podem alterar a metilação do DNA, prejudicar a homeostase hormonal e promover inflamações que resultam em alterações na densidade e na qualidade óssea. Além disso, estudos multigeracionais sugerem que as exposições ambientais, durante os estágios iniciais da vida, podem não apenas impactar a saúde óssea dos indivíduos expostos, mas também das gerações subsequentes. Tais efeitos transgeracionais ocorrem por meio de alterações epigenéticas herdáveis, incluindo mudanças na metilação do DNA e modificação de histonas, que afetam os processos de diferenciação osteoblástica e a manutenção da matriz óssea (Beard *et al.*,2000; Bianco-Miotto *et al.*,2017; Cano-Sancho *et al.*, 2017; Cluett *et al.*,2019; Kubota *et al.*, 2015; Li *et al.*,2024; Malcom, Valcarcel,2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; ScienceDirect, 2024).

Um estudo recente analisou como o microbioma intestinal, frequentemente alterado por exposições ambientais, pode influenciar modificações epigenéticas relacionadas à saúde óssea. A interação entre o microbioma e o sistema esquelético ocorre por meio de metabólitos microbianos que afetam diretamente a sinalização celular e a expressão de genes relacionados à formação e manutenção óssea (Beard *et al.*,2000; Bianco-Miotto *et al.*,2017; Cano-Sancho *et al.*, 2017; Cluett *et al.*,2019; Kubota *et al.*, 2015; Li *et al.*,2024; Malcom, Valcarcel,2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; ScienceDirect, 2024).

A identificação de mecanismos epigenéticos permanece desafiadora exigindo estudos longitudinais e análises integradas que combinem dados detalhados de exposições, epigenética e saúde óssea. Contudo, avanços nessa área oferecem a perspectiva de utilizar marcadores epigenéticos para identificar populações em risco de alterações ósseas, com a permissão de intervenções precoces que minimizem os efeitos adversos dos agrotóxicos e de outros fatores ambientais (Beard *et al.*,2000; Bianco-Miotto *et al.*,2017; Cano-Sancho *et al.*, 2017; Cluett *et al.*,2019; Kubota *et al.*, 2015; Li *et al.*,2024; Malcom, Valcarcel,2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; ScienceDirect, 2024).

Poucos estudos evidenciam a provável relação entre a exposição a baixas doses ao DDT e seus resíduos a alterações mineralógicas e na densidade óssea

(Glynn *et al.*,2000; Wallin *et al.*,2005), mas sabe-se que existe uma relação entre a exposição ao DDT e seus resíduos em hormônios androgênicos (Glynn *et al.*,2000; Wallin *et al.*,2005), que possuem associação direta na qualidade óssea. Estudos com mulheres no período pós-menopausa mostraram uma redução significativa da densidade óssea e alteração mineralógica na qualidade óssea (Beard *et al.*,2000; Rignell-Hydbom *et al.*,2009).

A densidade óssea é um parâmetro crítico para a análise da integridade e saúde do tecido esquelético e pode ser aferida por diversos métodos. Cada técnica apresenta princípios e características específicas, sendo a escolha do método determinada pelo tipo de osso a ser avaliado, a espécie em estudo e a precisão requerida para as medições, sendo assim, a mandíbula torna-se uma região anatômica de particular interesse, considerando-se três aspectos centrais: a densidade óssea mandibular é um indicador significativo das alterações sistêmicas no metabolismo ósseo, sensível a disfunções hormonais e metabólicas provocadas por agentes químicos; é composta tanto de osso cortical quanto trabecular, o que permite uma avaliação abrangente das possíveis interferências dos organoclorados em diferentes tipos de tecido ósseo; enquanto outros ossos do esqueleto apresentam diferenças significativas entre roedores e humanos, a estrutura mandibular dos ratos possui características histológicas que a tornam um modelo comparativo adequado para inferências em saúde humana (Beard *et al.*, 2006; BiancoMiotto *et al.*,2017; Glynn *et al.*, 2000; Castro, 2016; Sindeaux *et al.*, 2014; Rignell-Hydbom *et al.*, 2009).

Diante do problema apresentado, surge a questão sobre a hipótese da relação causal da exposição a agrotóxicos residuais de DDT, ao longo do tempo e em múltiplas gerações, e a alteração de densidade óssea em nascidos vivos.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a densidade óssea mandibular transgeracional em ratos púberes e adultos, submetidos à exposição pré e pós-natal a baixas concentrações de resíduos organoclorados, especificamente os derivados do DDT.

1.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Identificar as possíveis alterações ósseas trabeculares e corticais da mandíbula decorrentes da exposição aos metabólitos (DDD e DDE) do organoclorado DDT, bem como os efeitos em 2 gerações de ratos e ratas Wistar (geração parietal e geração progênie);

2.2.2 Comparar os parâmetros ósseos por meio de tomografias computadorizadas entre grupos controle e expostos aos metabólitos (DDD e DDE) do organoclorado DDT, em diferentes períodos de desenvolvimento (35 dias e 105 dias pós-natal), nas gerações F1 e F2.

2.2.3 Avaliar a influência da duração e continuidade da exposição nas gerações subsequentes sobre possíveis alterações na qualidade mineral e na densidade óssea.

2. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Agrotóxicos organoclorados e seus resíduos

Pesticidas ou defensivos agrícolas, popularmente conhecidos como agrotóxicos, são fortemente difundidos no controle de pragas, doenças e ervas daninha na agricultura. Dentre os diversos tipos de agrotóxicos, temos o grupo dos organoclorados, que foram amplamente utilizados nas décadas de 1950 e 1960, devido à eficácia no controle de pragas e sua disponibilidade persistente no ambiente. No entanto, ao longo dos anos, estudos científicos têm levantado preocupações sobre os malefícios associados ao uso desses produtos (Al Antary *et al.*, 2021; Dutra & Ferreira, 2017).

Os agrotóxicos organoclorados são compostos químicos que contêm carbono e cloro em sua estrutura. Sua persistência no ambiente permite que permaneçam no solo, na água e nos organismos por longos períodos após a aplicação. Um dos organoclorados mais conhecidos é o DDT (Diclorodifeniltricloroetano) que possui como produtos de degradação (Diclorodifenildicloroetano – DDD; Diclorodifenildicloroetileno - DDE) (Carrizo *et al.*, 2017; Eskenazia *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2020; Klaassen, 2013; Mansouri *et al.*, 2017; Vall *et al.*, 2014).

O diclorodifeniltricloroetano (DDT) é o mais conhecido dentre os agrotóxicos do grupo dos organoclorados e é considerado uma das substâncias sintéticas mais pesquisadas e utilizadas no século XX. Devido a suas propriedades inseticidas, foi amplamente utilizado no combate à malária, após sua descoberta em 1939, garantindo ao seu descobridor o Prêmio Nobel de Medicina (D'Mato *et al.* 2012).

Essa substância foi utilizada ainda na Segunda Guerra Mundial para prevenção do tifo, sendo borrifada sobre a pele dos soldados. Devido a seu baixo preço e alta eficácia, sua produção foi iniciada em 1945, em grande escala, sendo utilizado por quase 3 décadas na agricultura, como agrotóxicos. Porém, a grande revolução causada pela substância foi quanto ao combate à malária e outras doenças tropicais, inclusive no Brasil, devido à sua eficácia contra formas adultas dos mosquitos, bem como seu prolongado efeito residual (D'Mato *et al.*, 2012); isso fez com que, no período de 1946-1970, todos os programas de endemias apoiassem seu uso indiscriminado (Beard *et al.*, 2006). O grande efeito residual pode ser notado levando

em consideração que, até os tempos atuais, é possível encontrar concentrações, ainda que ínfimas, desses pesticidas em solo e na água (Fernandes *et al.*, 2020). Mansouri e seus colaboradores (2017) apontaram a presença do DDT e de seus resíduos em todas as regiões do planeta, de maneira que se fizeram presentes em amostras de solo, água, sedimentos e em animais marinhos principalmente de países da África (Figura 1). Ademais, o estudo apresentou o tempo de meia vida do DDT ($\frac{1}{2}$ vida de até 30 anos no solo e 56 dias na água), e de seus resíduos no solo (DDE até 672 dias e DDD até 160 dias) e na água (DDE até 160 dias e DDD até 190 anos), declarando que o tempo de degradação pode ser ainda maior em alguns ambientes (Mansouri *et al.*, 2017).

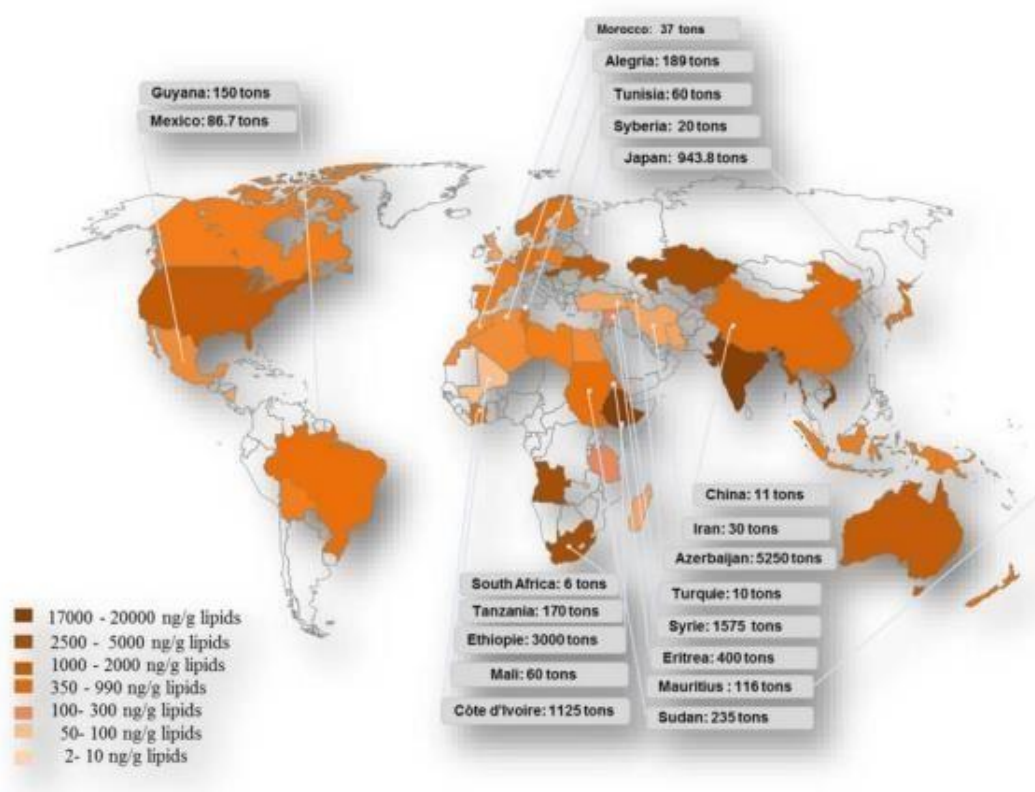


Figura 1 - Localização dos principais reservatórios de DDT em todo o mundo e as concentrações plasmáticas de DDE no tecido adiposo humano. Fonte: Mansouri et al. (2017).

Os organoclorados são conhecidos por serem altamente tóxicos para os seres vivos. A exposição aguda a esses agrotóxicos pode ocasionar sintomas, como náuseas, vômitos, convulsões e até morte. Além disso, a exposição crônica a níveis mais baixos desses compostos pode estar associada a problemas de saúde a longo

prazo, incluindo doenças neurológicas, reprodutivas e endócrinas. Isso porque tais substâncias têm a capacidade de se acumular nos tecidos gordurosos de animais e plantas. Quando esses organismos são consumidos por predadores, os compostos são transferidos ao longo da cadeia alimentar, elevando sua concentração a níveis mais altos na medida em que os níveis tróficos aumentam. Isso pode produzir a biomagnificação dessas substâncias, o que representa um risco significativo para os predadores no topo da cadeia alimentar, incluindo seres humanos (Marouani *et al.*, 2017; Migliaccio *et al.*, 2019; Pérez-Maldonado *et al.*, 2005; Pestana *et al.*, 2017).

O uso extensivo e indiscriminado de agrotóxicos organoclorados levou ao desenvolvimento de pragas resistentes a esses produtos. Além disso, sua persistência no ambiente significa que, mesmo após a suspensão de sua utilização, podem continuar a representar um risco por um longo período de tempo. Devido aos riscos associados aos agrotóxicos organoclorados, muitos países implementaram regulamentações e restrições em sua utilização (Convenção de Estocolmo, 2018; D'Mato *et al.*, 2012; Mansouri *et al.*, 2017).

Apesar da ampla utilização desses produtos até meados da década de 70, em 1962, foi lançado um grande manifesto ambientalista ponderando sobre o uso indiscriminado desse agrotóxico. Rachel Carlson, em seu livro intitulado “Primavera silenciosa”, critica o uso do DDT e destaca a necessidade de respeitar o ecossistema para preservar a saúde humana e o meio ambiente (D'Mato *et al.*, 2012). Após o manifesto, ainda na década de 70, a Suécia foi o primeiro país do mundo a banir o DDT, seguida de outros países. Já no Brasil, em 1971, as primeiras medidas restritivas foram efetivadas pela Portaria 356/71, que proibia sua fabricação e comercialização para uso doméstico, mantendo ainda os produtos para uso tópico. Posteriormente, a Portaria nº 357/71 proibiu, em todo o território nacional, o uso de inseticidas organoclorados em controle de pragas em pastagens. Em 1985, o uso desses elementos para a pecuária foi proibido, sendo ainda permitido de forma restrita e controlada, em campanhas de saúde pública no combate a vetores da malária e da leishmaniose. O Acordo de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes é um exemplo internacional desse esforço para controlar o uso e a produção desses compostos (Convenção de Estocolmo, 2018; Mansouri *et al.*, 2017).

Dessa forma, embora quase 60 anos tenham se passado da publicação de “Primavera Silenciosa”, os questionamentos realizados pela cientista Rachel Carson

ainda vão de encontro com as concentrações de DDT e de seus resíduos presentes em todo o ecossistema. Diante do exposto, torna-se urgente e necessário estudarmos constantemente os grandes problemas que impactam a saúde humana, de preferência em equipe, de forma multidisciplinar, realizando conexões entre os diferentes conhecimentos na busca de soluções para os grandes problemas socioambientais (D'Mato *et al.*, 2012).

Dadas as propriedades físico-químicas dos diferentes tipos de agrotóxicos, o acúmulo deles nos organismos vivos varia de acordo com as condições ambientais e o tempo de exposição (Beard *et al.*, 2006). Sabe-se que grande parte do DDT bioacumulado nos peixes é absorvida a partir do corpo dos organismos que o consomem e sugere-se, portanto, que, a partir disso, possam ocorrer efeitos em cascata no meio ambiente, por exemplo, a redução da população de aves e peixes predadores, o que gera um desequilíbrio ao ecossistema (Beard *et al.*, 2006). Além disso, uma vez que o DDT é armazenado no tecido adiposo e eliminado pelo leite, há registros da contaminação por DDT e outros organoclorados, na América Latina, em carne bovina, carne de aves, leite, frutas, hortaliças, legumes, cacau, arroz e até mesmo em óleos, de milho, soja, girassol e oliva. Estima-se que cerca de 90% do DDT e metabólitos retidos no organismo dos seres humanos seja proveniente da alimentação (D'Mato *et al.*, 2012).

A classe de agrotóxicos organoclorados é lipossolúvel e de lenta metabolização, promovendo considerável absorção tecidual, que é facilmente absorvida pelas vias digestivas e respiratórias, bem como facilmente acumulados em tecido adiposo (Beard *et al.*, 2006). Os organoclorados agem sobre o sistema nervoso central, resultando em alterações comportamentais, distúrbios sensoriais, sendo que o DDT atinge o equilíbrio do sistema sódio/potássio, podendo ocasionar convulsões, paralisia e até a morte do indivíduo. Salienta-se que, em casos de intoxicação aguda, os sintomas iniciais, como hiperexcitabilidade, parestesia na língua e lábios, desorientação, fotofobia, cefaleias persistentes, fraqueza, vertigem, convulsões ocorrem em até 2 horas após a exposição (Beard *et al.*, 2006). Não obstante, podem ocorrer manifestações devido à exposição crônica, como câncer e anormalidades musculoesqueléticas; ademais, podem também promover efeitos obesógenos, comprovados pela relação direta dos níveis sanguíneos de DDT com o IMC e o aumento de adipocinas (Cano-Sancho *et al.*, 2017). Além disso, há relatos da

exposição crônica promover defeitos do tubo neural, anormalidades urogenitais e cardiovasculares, disfunções reprodutivas (Mamane *et al.*, 2015), distúrbios metabólicos (Kalliora *et al.*, 2018; Mamane *et al.*, 2015), além da restrição de crescimento intrauterino, nascimento prematuro e anomalias congênitas (Kalliora *et al.*, 2018; Góralczyk e Majcher, 2019).

3.2 Importância dos estudos a longo prazo com modelos animais na avaliação da toxicidade do DDT e de seus resíduos

As respostas biológicas são sensíveis às condições sociais e ambientais (variáveis intervenientes), de forma que podem elevar os riscos de agravos à saúde (Olvera Alvarez *et al.*, 2018). Nos estudos com a população, variáveis intervenientes, relacionadas ao comportamento humano e que não são passíveis de controle, tornam os resultados experimentais complexos e de difícil interpretação. Dessa forma, experimentos com modelos animais são importantes e necessários na elucidação dos mecanismos de toxicidade, pois, mesmo que o modelo biomédico por si só não consiga explicar a complexa relação entre a saúde do homem e os determinantes socioambientais, os experimentos *in vivo* tornam as condições do estudo possíveis de serem controladas. Para demonstrar a ocorrência de mecanismos de toxicidade após um longo período de exposição, estudos a longo prazo são realizados em um período correspondente a toda vida do animal, no qual a exposição às substâncias testes ocorre por todo tempo de observação, ou em boa parte dele (Azevedo; Chasin, 2003). Nesse tipo de estudo, os animais são avaliados semanalmente e análises bioquímicas no sangue e nos tecidos são realizadas, com o objetivo de identificar anormalidades que podem ser produzidas pelas substâncias químicas em grupos expostos em relação aos grupos “controle da exposição”. Isso torna viável a avaliação das diferentes condições ambientais, como a exposição ao DDT ou aos seus resíduos (Olvera Alvarez *et al.*, 2018). Bacarelli e Bollati (2011) mostraram a importância dos resultados obtidos a partir de estudos a longo prazo e por multigerações com modelos animais na elucidação de como as exposições intrauterinas ou no início da vida a estímulos ambientais podem produzir efeitos herdados nas gerações seguintes. Dessa forma, é possível simular no modelo animal a relação homem ambiente e definir relações relevantes decorrentes dessa exposição. Para a análise dos riscos da

exposição aos xenobióticos pelo homem, os órgãos regulamentadores consideram os seguintes valores críticos: NOAEL/NOEL – No Observed Adverse Effect Level. O NOAEL representa a dose inferior à observação de qualquer efeito, correspondendo a um valor-limite resultante da relação dose resposta que não causa efeitos adversos observáveis para o homem e para organismos expostos a um determinado contaminante químico (ATSDR, 2022). Quando a dose inferior à observação de qualquer efeito obtida é referente a um contaminante químico conhecidamente carcinogênico, o valor crítico é representado pela sigla NOAEL (ATSDR, 2022). Dessa forma, sabendo que o DDT (IRIS, 2002), DDD (EPA, 2017a) e DDE (EPA, 2017b) são classificados como carcinogênicos do grupo B (prováveis carcinógenos humanos), a obtenção do NOAEL torna-se inatingível para esses compostos. LOAEL – Low Observed Adverse Effect Level representa a dose mais baixa de um determinado contaminante químico, que pode causar algum efeito adverso ao ecossistema ou ao homem (ATSDR, 2022). A partir dos valores críticos obtidos em estudos com animais, é definida uma Dose de Referência (RfD), sendo essa uma estimativa da exposição oral diária da população humana que provavelmente não apresenta risco apreciável de efeitos deletérios ao longo da vida (ASTD, 2022; Chiu *et al.*, 2018). A RfD é considerada uma dose-limite de segurança para a exposição humana. Essa grandeza é obtida por meio de cálculos matemáticos que utilizam o valor crítico, NOAEL/NOEL ou LOAEL, obtido nos estudos experimentais e que levam em consideração critérios que quantificam a incerteza dos dados científicos disponíveis (ATSDR).

Observa-se que, embora limites de exposição para o DDT e seus resíduos tenham sido estabelecidos, até a presente data, nenhum estudo crônico conseguiu estabelecer o NOEL das isoformas p,p'-DDD e do p,p'DDE. Ademais, somado ao efeito carcinogênico, o DDT e seus resíduos mimetizam a ação de alguns hormônios, os quais são, assim, classificados como desreguladores endócrinos. Logo, considerando que hormônios atuam em concentrações que variam em grandezas de ng/mL a pg/mL, mesmo em níveis extremamente baixos, nenhuma exposição ao DDT e seus resíduos deve ser considerada segura (Timokhina;Yaglov; Nazimova; 2021).

3.3. Estudos em múltiplas gerações na avaliação da toxicidade do DDT e de seus resíduos

Os estudos experimentais em múltiplas gerações têm por finalidade esclarecer a toxicidade sistêmica causada por contaminantes ambientais, como os agrotóxicos, na geração parental e em seus descendentes (Jawaid; Jehle; Mansuy, 2020; Martin *et al.*, 2009). Os estudos em múltiplas gerações estendem-se a duas ou mais gerações, em que os efeitos dos agentes tóxicos são observados em filhos e netos daqueles que inicialmente foram expostos a determinados estímulos (Martos; Tang; Wang, 2016). No entanto, ao contrário do que se explica na genética mendeliana, as alterações observadas nos estudos multigeracionais possivelmente surgem a partir de ações epigenéticas que são transmitidas aos descendentes promovendo alterações fenotípicas de herança intergeracional ou transgeracional, associadas à ausência de modificações no DNA (Baccarelli; Bollati, 2011; Skvortsova; Iovino; Bogdanović, 2018; Tuscher; Day, 2019). A herança epigenética intergeracional ocorre com a exposição dos pais a estímulos que levam a alterações das células germinativas e que são observadas nas células somáticas dos filhos, mas não são observadas nos netos. Para a herança epigenética ser considerada transgeracional, ela deve ser encontrada nas células germinativas dos pais e de seus filhos, decorrente de uma exposição a um estímulo na geração parental antes da gestação, e nas células somáticas de netos ou bisnetos (Anway *et al.*, 2005; Tuscher; Day, 2019). Atrelada aos estudos em múltiplas gerações, a epigenética tem levantado a hipótese de que contaminantes ambientais, como os POP's (Poluentes Orgânicos Persistentes), desencadeiam a reprogramação celular resultando em alterações das funções celulares e fenotípicas (Lappalainen; Greally, 2017; Martos; Tang; Wang, 2016). Entre os POP's, o DDT e seus resíduos são um dos principais contaminantes ambientais investigados como potencialmente responsáveis por modificações epigenéticas que promovem riscos à saúde (Collotta; Bertazzi; Bollati, 2013).

O estudo de Lapehn e Paquette (2022) foca no papel da placenta como órgão crucial para avaliar exposições pré-natais devido à sua função na troca de oxigênio, nutrientes, resíduos e sinais endócrinos entre mãe e feto. Entre 2016 e 2021, 28 estudos investigaram a relação entre exposições pré-natais e epigenômica placentária, incluindo metilação de DNA e estudos transcriptômicos de mRNA, lncRNA e microRNAs. Assim exposições, como o tabagismo materno, estressores

psicossociais, produtos químicos, poluição do ar e metais, foram analisadas. Dezesesseis desses estudos conectaram exposições a desfechos de saúde, como peso ao nascer, crescimento fetal ou neurocomportamento infantil, utilizando análises de mediação, identificação de associações compartilhadas e análise de redes. Os resultados demonstram que a epigenética placentária pode servir como base para futuros estudos que busquem compreender as relações entre o ambiente pré-natal e complicações perinatais ou saúde infantil a longo prazo. A epigenômica placentária oferece uma oportunidade única para expandir a premissa DOHaD, especialmente se forem aplicadas metodologias inovadoras, como análise multiômica, sequenciamento de RNAs não codificantes, análise de misturas e avaliação de desfechos de saúde além da primeira infância (Kubota *et al.*, 2015; Lapehn; Paquette, 2022).

O estresse, durante a gravidez, pode impactar negativamente os resultados de saúde dos descendentes. Estudos em humanos e animais mostram que adversidades no início da vida, especialmente durante o desenvolvimento intrauterino, podem ter efeitos programadores nos resultados de saúde pós-natal. A teoria da Programação Fetal (Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD) sugere que o estresse pré-natal pode alterar o funcionamento de sistemas fisiológicos no feto, resultando em mudanças duradouras na estrutura e função dos órgãos fetais. Estudos mostram que o estresse materno, durante a gravidez, pode aumentar o risco de várias doenças na vida adulta dos descendentes. Isso inclui problemas respiratórios, imunológicos, obesidade, metabolismo, entre outros. Epigenética refere-se a modificações químicas no DNA que regulam a transcrição genômica. Três principais mecanismos epigenéticos são: metilação do DNA, modificação de histonas, microRNA. Estudos em animais demonstram que o estresse pré-natal e a exposição a glicocorticoides podem ter efeitos duradouros na expressão de genes associados à função do eixo HPA e função neurológica. As evidências em humanos, mediadas por mecanismos epigenéticos, confirmam os achados observados em estudos com animais, demonstrando que o estresse pré-natal pode provocar alterações epigenéticas que influenciam os desfechos de saúde da prole. Genes envolvidos na via dos glicocorticoides, como NR3C1, 11 β -HSD2 e FKBP5, são frequentemente investigados nesse contexto.

Dois experimentos naturais importantes são discutidos; o primeiro é o estudo da fome holandesa de 1944-1945, que mostra que a subnutrição pré-natal pode ter efeitos duradouros para a saúde, incluindo doenças cardíacas, diabetes, obesidade e saúde mental; o segundo é o Projeto Ice Storm, que demonstra o impacto do desastre natural no Quebec, Canadá e o estresse pré-natal, que pode levar a mudanças na metilação do DNA associadas a funções imunológicas e desenvolvimento neurocomportamental. Evidências sugerem que o estresse experimentado pela mãe, durante a gravidez, pode ser transmitido para gerações subsequentes, afetando a saúde e o comportamento dos descendentes. O estresse pré-natal pode ocasionar alterações epigenéticas duradouras que afetam o desenvolvimento e a saúde dos descendentes. Estudos futuros devem continuar a explorar esses mecanismos e suas implicações para a saúde humana. Ainda, há desafios a serem abordados na pesquisa sobre estresse pré-natal e epigenética, como entender a especificidade de tempo e sexo, a complexidade da epigenética e a análise de mediação (Kubota *et al.*, 2015; Cao-Lei *et al.*, 2024).

3.4 Metabolismo ósseo e epigenética

O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica, composta por componentes orgânicos e inorgânicos que trabalham em conjunto para proporcionar sustentação, proteção, mobilidade e equilíbrio metabólico ao organismo. Ele é constantemente remodelado, o que é um processo essencial para sua plasticidade e funcionalidade, que garante a manutenção da saúde óssea e a adaptação às demandas biomecânicas (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez & Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno & Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik & Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt & Partridge, 2010).

3.4.1 Composição do Tecido Ósseo

A fase orgânica representa cerca de 30% do tecido ósseo e é composta principalmente pela matriz óssea orgânica e pelas células ósseas que são os osteoblastos (responsáveis pela formação óssea), os osteócitos (células maduras que mantêm o tecido ósseo) e os osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea). A matriz óssea é composta por colágeno tipo I, que fornece resistência e flexibilidade,

além de proteínas não colagenosas, como osteocalcina e osteopontina, que regulam o processo de mineralização (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez & Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno & Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik & Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

A fase inorgânica representa aproximadamente 70% da composição óssea e é formada principalmente por cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que conferem rigidez e força ao osso. Essa fase é crucial para a resistência mecânica e para a capacidade do osso de armazenar íons, como cálcio e fósforo (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez, Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno & Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasi, Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

3.4.2 Tipos de osso no tecido maduro

O osso cortical (Compacto) constitui cerca de 80% da massa óssea e apresenta uma estrutura densa, ordenada e organizada em unidades chamadas osteonas (ou sistemas de Havers). É responsável pela resistência mecânica e pela capacidade de suportar cargas (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez, Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik, Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

O osso trabecular (Esponjoso) representa 20% da massa óssea e possui uma estrutura porosa, composta por trabéculas, que garantem leveza ao esqueleto e resistência à compressão. Localiza-se nas extremidades dos ossos longos e em áreas, como vértebras e epífises, desempenhando papel fundamental no armazenamento de cálcio e na manutenção do metabolismo mineral (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez & Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik, Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

3.4.3 Metabolismo ósseo e remodelação

A remodelação óssea é um processo dinâmico e contínuo que envolve a formação e a reabsorção do tecido ósseo, permitindo a renovação da matriz óssea e a reparação de microdanos. Esse processo é mediado pelo equilíbrio entre os

osteoclastos que reabsorvem o osso antigo, liberando cálcio para o organismo e os osteoblastos que depositam nova matriz óssea e iniciam sua mineralização (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez, Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik, Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

Esse processo precisa funcionar adequadamente para garantir a homeostase óssea e evitar desequilíbrios que possam levar a condições, como osteoporose (excesso de reabsorção) ou osteopetrose (formação óssea excessiva e desorganizada) (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez, Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik, Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

3.4.4 Epigenética no metabolismo ósseo

A plasticidade e a remodelação óssea são reguladas por uma interação complexa entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. A metilação do DNA influencia a expressão de genes envolvidos na osteogênese e na reabsorção óssea, enquanto a modificação de histonas regula a acessibilidade da cromatina e a ativação de genes osteogênicos. Além disso, os microRNAs modulam a diferenciação de osteoblastos e osteoclastos, afetando diretamente o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.

(Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez & Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik, Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

Estudos mostram que fatores ambientais, como a exposição a agrotóxicos, podem interferir nas vias epigenéticas do metabolismo ósseo, alterando a expressão de genes que regulam a mineralização e a integridade do tecido ósseo (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez, Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik, Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

3.5 Alterações no tecido ósseo detectadas por imagens

A avaliação de alterações no tecido ósseo, especialmente nas porções trabecular e cortical, é essencial para compreender os impactos de fatores externos, como

agrotóxicos, na qualidade óssea. Técnicas de imagem, como tomografia computadorizada, são ferramentas valiosas para identificar redução da densidade óssea, alterações na organização das trabéculas ósseas e afinamento ou espessamento anormal do osso cortical (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez, Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik, Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

A identificação dessas alterações é fundamental para relacionar exposições ambientais a desordens ósseas, especialmente quando mediadas por mecanismos epigenéticos (Beard *et al.*, 2000; Marie, 2013; Zaidi, 2007; Bonewald, 2011; Hernandez, Majeska, 2018; Wang *et al.*, 2023; Pizzorno, Pizzorno, 2021; Florencio-Silva *et al.*, 2015; Karasik, Kiel, 2012; Liu *et al.*, 2013; Raggatt, Partridge, 2010).

3.6 Efeitos dos agrotóxicos organoclorados e seus resíduos na densidade óssea

Estudos recentes indicam que a exposição a diversos produtos químicos ambientais, incluindo agrotóxicos, pode influenciar negativamente a saúde óssea, principalmente por meio da interferência hormonal. Muitos agrotóxicos atuam como disruptores endócrinos, interferindo na produção e regulação hormonal. Isso pode afetar diretamente a saúde óssea, pois hormônios, como estrogênio e testosterona, desempenham papéis cruciais na manutenção da densidade óssea. A exposição a pesticidas organofosforados, por exemplo, tem sido associada à perda óssea devido à disfunção renal e à obstrução da conversão da vitamina D na sua forma ativa, essencial para a saúde óssea. Além dos agrotóxicos, outros poluentes ambientais, como metais pesados e partículas de poluição do ar, também foram associados a uma diminuição na densidade mineral óssea. Esses poluentes podem levar à deficiência de vitamina D, que é crucial para a absorção de cálcio e manutenção da saúde óssea. Esses agentes podem se ligar e ativar ou inativar importantes receptores hormonais, como os receptores de estrogênio e andrógeno, perturbando a síntese, metabolismo e níveis naturais de hormônios; essa disrupção hormonal pode ter efeitos profundos na densidade óssea, bem como na saúde geral. Estudos com retardadores de chama, como os éteres difenil polibromados (PBDEs) e os retardadores de chama organofosforados (OPFRs), mostraram que essas

substâncias podem alterar os níveis de hormônios da tireoide, que são críticos para o desenvolvimento ósseo, especialmente em crianças. Pesquisas clínicas e epidemiológicas indicam que a exposição a pesticidas está associada a riscos aumentados de várias condições de saúde, incluindo disfunções hormonais que afetam a saúde óssea. Por exemplo, mulheres na pós-menopausa expostas a níveis elevados de mercúrio apresentaram maior prevalência de osteoporose. A relação entre a exposição a agrotóxicos, hormônios e densidade óssea é complexa e multifatorial. A evidência sugere que minimizar a exposição a esses produtos químicos pode ser benéfico para a saúde óssea e hormonal. Medidas preventivas, como evitar alimentos com altos níveis de pesticidas e utilizar purificadores de ar, podem ajudar a reduzir o impacto desses poluentes na saúde (Chen *et al.*, 2013; Cluett *et al.*, 2019; Barr *et al.*, 2010; Jalili *et al.*, 2020; Pizzorno; Pizzorno, 2021).

Os agrotóxicos organoclorados podem ter complicações na densidade óssea, afetando a saúde dos ossos. Embora as pesquisas nessa área ainda não sejam tão extensas quanto em outros aspectos dos agrotóxicos, alguns estudos sugerem uma possível associação entre a exposição a esses compostos e problemas ósseos (CanoSancho *et al.*, 2017; Kalliora *et al.*, 2018; Góralczyk e Majcher, 2019; Mamane *et al.*, 2015). Algumas das principais complicações incluem: osteoporose - exposição crônica a agrotóxicos organoclorados pode estar relacionada a um maior risco de osteoporose em adultos. Osteoporose é uma condição em que a densidade óssea diminui, tornando os ossos mais fracos e mais suscetíveis a fraturas (Beard *et al.*, 2000; Glynn *et al.*, 2000; Rignell-Hydbom *et al.*, 2009; Wallin *et al.*, 2005); redução da mineralização óssea – a exposição a agrotóxicos organoclorados pode interferir na absorção de minerais importantes para a saúde dos ossos, como cálcio e fósforo. A redução da mineralização óssea pode ocasionar a diminuição da densidade óssea e a fragilidade dos ossos (Beard *et al.*, 2000; Glynn *et al.*, 2000; Rignell-Hydbom *et al.*, 2009; Wallin *et al.*, 2005); efeito sobre hormônios - alguns agrotóxicos organoclorados atuam como desreguladores endócrinos, o que significa que podem interferir no funcionamento dos hormônios. Desregulações hormonais podem afetar a saúde dos ossos, uma vez que os hormônios desempenham um papel fundamental na regulação da formação e reabsorção óssea (Beard *et al.*, 2000; Cano-Sancho *et al.*, 2017; Glynn *et al.*, 2000; Kalliora *et al.*, 2018; Mamane *et al.*, 2015; Rignell-Hydbom *et al.*, 2009; Wallin *et al.*, 2005); interferência no metabolismo da vitamina D- a vitamina D

é essencial para a saúde óssea, pois auxilia a absorção do cálcio pelos ossos. Algumas pesquisas indicam que a exposição a agrotóxicos organoclorados pode interferir no metabolismo da vitamina D, prejudicando sua disponibilidade para os ossos (Beard *et al.*, 2000; Glynn *et al.*, 2000; Rignell-Hydbom *et al.*, 2009; Wallin *et al.*, 2005); impacto no sistema imunológico – a exposição a agrotóxicos organoclorados pode levar à ativação do sistema imunológico, desencadeando processos inflamatórios que, em alguns casos, podem afetar negativamente a saúde dos ossos (Beard *et al.*, 2000; Cano-Sancho *et al.*, 2017; Wallin *et al.*, 2005).

A avaliação da densidade óssea é fundamental para monitorar a saúde e a qualidade do tecido esquelético, com diversos métodos disponíveis, cada qual com especificidades técnicas e requisitos de precisão. A seleção do método de análise depende de fatores, como o tipo de osso, a espécie e a finalidade da pesquisa. Nesse contexto, a mandíbula apresenta-se como uma região-chave, pois sua densidade óssea reflete de maneira consistente as condições sistêmicas de metabolismo ósseo, sendo especialmente sensível a disfunções causadas por agentes químicos. Além disso, a composição da mandíbula — que inclui osso cortical e trabecular — permite uma análise mais detalhada dos possíveis efeitos de substâncias químicas, como os organoclorados sobre diferentes estruturas ósseas. Apesar das variações anatômicas entre espécies, a estrutura mandibular de ratos apresenta características histológicas que a tornam um modelo útil para investigar condições que afetam a saúde óssea em humanos. Esses fatores justificam seu uso para explorar o impacto de exposições químicas na qualidade e densidade dos ossos (Beard *et al.*, 2006; Glynn *et al.*, 2000; Castro, 2016; Sindeaux *et al.*, 2014; Rignell-Hydbom *et al.*, 2009).

Vale ressaltar que os estudos sobre a relação entre agrotóxicos organoclorados e a densidade óssea ainda estão em andamento; os resultados podem variar dependendo do tipo de agrotóxico, níveis de exposição e outros fatores individuais e ambientais. Além disso, muitos desses compostos foram proibidos em diversos países devido aos riscos à saúde, o que pode ajudar a reduzir a exposição em algumas regiões.

Diante dessas preocupações, é importante que as autoridades de saúde e os pesquisadores continuem a investigar os efeitos dos agrotóxicos organoclorados na saúde óssea, além do fato de que medidas de controle e regulamentação sejam implementadas para proteger a saúde pública. A adoção de práticas agrícolas

sustentáveis e o uso de alternativas mais seguras aos agrotóxicos organoclorados podem ser importantes para reduzir os riscos associados à exposição desses compostos. Além disso, é fundamental seguir as diretrizes de segurança e precauções ao manusear esses produtos em ambientes agrícolas para proteger a saúde dos trabalhadores rurais e da população em geral.

4.MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O experimento possui um delineamento inteiramente causal, com esquema fatorial quadruplo (DDD, DDE, idade e geração). Foi realizado com 36 ratos albinos da linhagem Wistar, 24 fêmeas e 12 machos, com 8 semanas de idade, não consanguíneos, que foram acasalados e denominados como geração parental. Em continuidade, o estudo foi realizado com a prole descendente (geração F1) dessa geração parental e com a geração descendente da geração F1 (geração F2).

4.2 Formulação de água com concentrações-traço de resíduos do DDT

Os padrões de pesticidas, 1,1-Dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (p,p'-DDD) e 2,2-Bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichlorethen1,1(p,p'DDE), adquiridos da Sigma Cheminal Co. (St. Louis, MO, EUA), foram dissolvidos em álcool etílico (99,5°GL, Sigma Cheminal Co) para a obtenção das soluções estoque de DDD e DDE, em uma concentração previamente encontrada no solo de uma região do Oeste do Paraná. As soluções foram mantidas refrigeradas a 4°C e protegidas da luz durante todo o experimento. A partir das soluções estoques, os pesticidas foram adicionados à água potável para obtenção de água com concentrações traço de DDD (0,0147 µM; 0,0047 mg/L) e DDE (0,0056 µM; 0,0018 mg/L), que foram ofertadas aos animais *ad libitum*, conforme o delineamento experimental. Para fins de padronização, a água administrada em todos os grupos obteve o volume final de álcool etílico, utilizado com veículo, ajustado em 0,01% (Pestana *et al.*, 2017).

4.3 Animais

Ratos e ratas albinos da linhagem Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Investigações Biológicas – LinBio da mesma instituição. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno a 22°C (± 2°C), em um ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas, com exaustão de ar, alimentados

com dieta padrão para roedores e água potável à vontade. O protocolo experimental que foi realizado seguiu as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unioeste.

4.3.1 Geração parental

Após um período de aclimação no Biotério Setorial do Laboratório de Investigações Biológicas - LInBio (10 a 14 dias), os 36 ratos com 70 dias pós-natal (PND70) foram alojados para o acasalamento (proporção de 2 fêmeas:1 macho), sendo mantidos juntos durante 5 dias (duração do ciclo estral). A confirmação da prenhez das fêmeas foi estabelecida no dia 0 de gestação (PG0) pela presença de espermatozoides em esfregaços vaginais. No PG0, as ratas prenhas foram separadas em 4 grupos (n=6/grupo), conforme apresentado a seguir:

- Grupo controle: ofertada água de torneira *ad libitum*;
- Grupo DDD: ofertada água de torneira *ad libitum* contendo DDD (0,0147 µM; 0,0047 mg/L);
- Grupo DDE: ofertada água de torneira *ad libitum* contendo DDE (0,0056 µM; 0,0018 mg/L);

Para avaliar os efeitos dos resíduos de DDT na prole das ratas expostas no período pré e pós-natal, foram fornecidas formulações de água de torneira *ad libitum* desde o PG0 (duração de 21 dias pré-natal), como também durante todo o período de amamentação (21 dias pós-natal). No final do período de amamentação, as ratas da geração parental foram eutanasiadas com overdose de anestésicos (Cetamina 300 mg.Kg⁻¹ e Xilazina 45 mg.Kg⁻¹). A prole descendente da geração parental foi denominada como geração F1.

4.3.2 Gerações descendentes (F1 e F2)

Após o desmame (PND22), as proles foram diferenciadas sexualmente. Os 3 grupos da geração F1 (Controle, DDD, DDE) contêm o número de filhotes

selecionados padronizados em 6 machos e 15 fêmeas. A geração F1 recebeu o mesmo protocolo de tratamento já descrito para a geração parental inicialmente, sendo mantido o fornecimento durante todo o desenvolvimento, formulações de água com os respectivos padrões de resíduos do DDT de acordo com os respectivos grupos (Controle, DDD, DDE). A geração F2 recebeu o mesmo protocolo de tratamento já descrito para a geração F1, sendo mantido o fornecimento durante todo o desenvolvimento, formulações de água com os respectivos padrões de resíduos do DDT, de acordo com os respectivos grupos (Controle, DDD, DDE), conforme descrito na Figura 2.

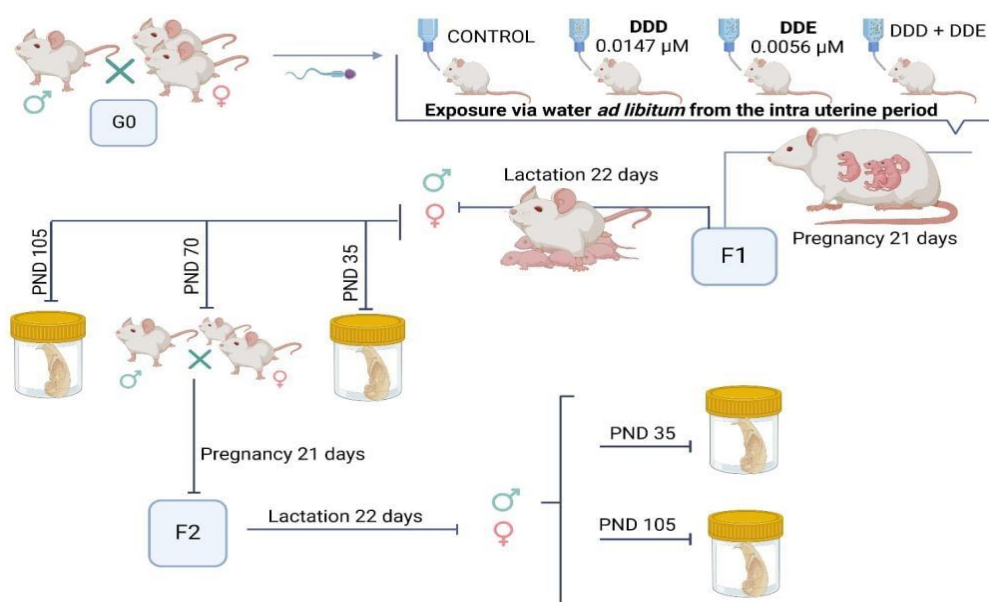


Figura 2 – Delineamento experimental esquematizado. O esquema apresenta o delineamento do experimento com resíduos de DDT (DDD e DDE), incluindo os grupos controle e combinado (DDD + DDE). A geração parental (G0) foi exposta à água, contendo resíduos desde o período intrauterino (gestação de 21 dias) até a lactação (22 dias). A prole (F1) foi separada por sexo no desmame (PND22) e continuou sob o mesmo protocolo de exposição durante o desenvolvimento. A geração F2, descendente da F1, seguiu o mesmo tratamento. As análises foram conduzidas nos períodos de 35 dias (PND35) e 105 dias pós-natal. Fonte: Biorender.

4.4 Avaliação das gerações descendentes (F1 e F2)

Com 35 dias pós-natal (PND35) e 105 dias pós-natal (PND105), a cada eutanásia, foram avaliadas as seguintes variáveis: número de filhotes nascidos vivos e mortos por fêmea, peso ao nascer, relação de machos e fêmeas por ninhada e peso corporal no dia da eutanásia. As mandíbulas foram coletadas e posteriormente realizadas tomografias computadorizadas para avaliar a densidade óssea. Foram realizadas tomografias computadorizadas utilizando o aparelho Orthopantomograph™ OP300 (Figura 3), com campo de visão (FOV) de 61 × 48 mm, operando a 90 kV e 10 mA durante 13 segundos. A exposição total foi de 1062 mGy·cm², resultando em 300 imagens, que foram visualizadas e analisadas por meio do software RadiAnt DICOM Viewer.

Foram avaliadas cinco regiões de interesse: três no trabeculado ósseo mandibular e duas na cortical mandibular, conforme a metodologia descrita por Sindeaux et al. (2014). Dentre os parâmetros analisados, destaca-se o Índice Cortical Mandibular (ICM), que consiste em uma avaliação visual da cortical mandibular distal ao forame mental, observada em imagens sagitais e classificada segundo a classificação de Klemetti (Figura 4). A análise foi realizada bilateralmente, e a média dos lados foi utilizada, conforme descrito por Castro (2016).

Também foi avaliada a Espessura Cortical Mental (ECM), que representa a espessura da cortical mandibular na região do forame mental, medida de acordo com a metodologia proposta por Ledgerton et al. (1997). Essa medição é realizada por meio de uma linha perpendicular traçada entre duas linhas paralelas que delimitam a cortical mandibular (Figura 5). Assim como o ICM, essa avaliação é bilateral e a média dos valores é considerada na análise final (Castro, 2016).

Além disso, analisou-se o Índice Mental Panorâmico (IMP), nas porções superior (S) e inferior (I), que corresponde à razão entre a espessura da cortical mandibular e a distância entre a abertura do forame mental (superior e inferior) até o córtex mandibular inferior, obtida por meio de radiografias panorâmicas (Figuras 6 e 7). Para a interpretação dos dados, foi utilizado o valor total resultante da soma dos índices superior e inferior (Castro, 2016).

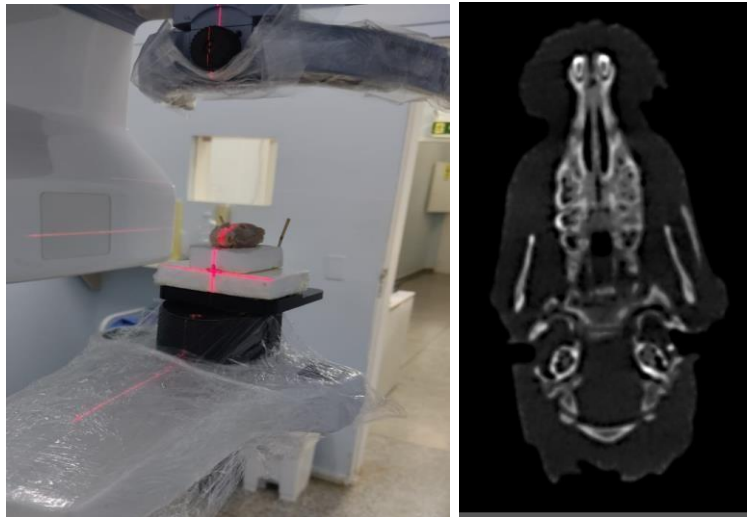


Figura 3. Orthopantomograph™ OP300, no FOV de 61X48mm, utilizado 90kV, 10mA por 13 segundos, expondo a peça a 1062mGycm² gerando 300 imagens.

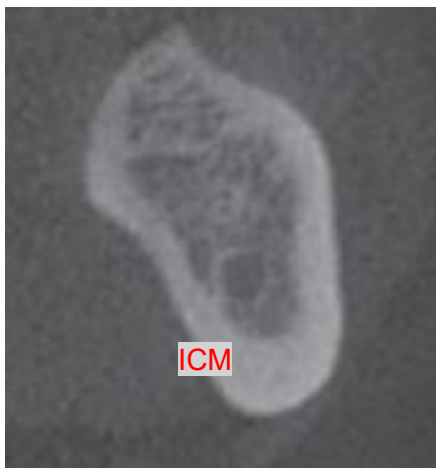
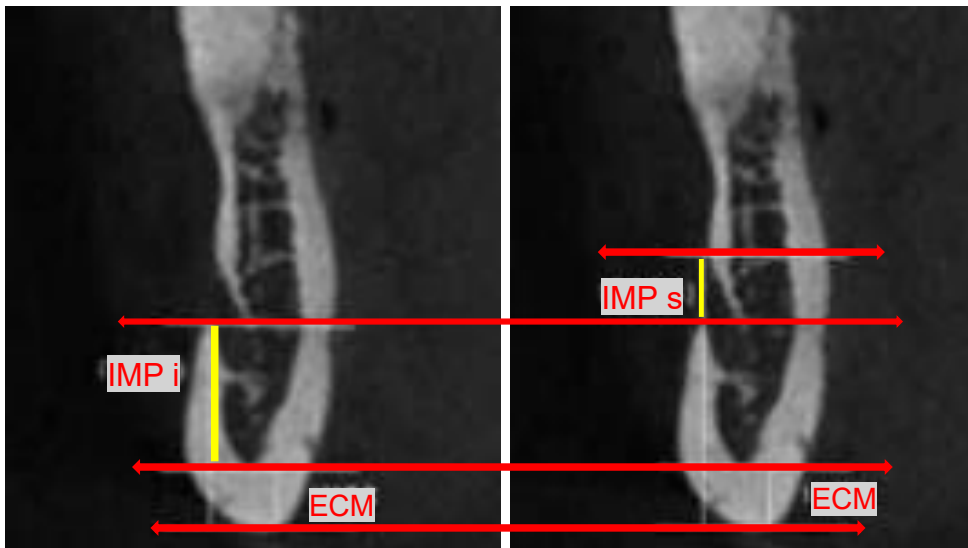


Figura 4. ICM (Índice Cortical Mandibular): simboliza o índice cortical mandibular (ICM) utilizados em radiografias panorâmicas. A análise da cortical mandibular que é avaliado a partir de imagens sagitais. É avaliado visualmente, distalmente ao forame mentual, bilateralmente, e classificado segundo a classificação de Klementi. Fonte: Castro, 2016.



Figura 5. ECM (Espessura Cortical Mental) representa a espessura cortical mandibular na região do forame mental, conforme descrito por Ledgerton *et al.*, 1997 e é medido pela espessura da cortical mandibular numa linha perpendicular a duas linhas paralelas que delimitam a cortical mandibular na região do forame mental. Fonte: Castro, 2016.



Figuras 6 e 7. IMP superior (S) e inferior (I) que simboliza o índice mandibular panorâmico (IMP) utilizados em radiografias panorâmicas, sendo a razão entre a espessura da cortical mandibular e a distância entre a abertura do forame mental (superior e inferior) e o córtex mandibular inferior. Fonte: Castro, 2016.

4.5 Análise Estatística

As variáveis obtidas foram analisadas estatisticamente após a verificação dos pressupostos de normalidade (Teste MCW E cálculos FD). Visto esses fatores e seus respectivos níveis, caso os pressupostos estatísticos forem aceitos, realiza-se a Análise da Variância Fatorial, seguido do teste de LSD-Fisher, em caso de significância estatística ($p < 0,05$). Caso os pressupostos estatísticos não sejam aceitos, aplica-se o modelo linear generalizado (GLM), utilizando a distribuição Gamma. Todas as análises utilizaram um nível de significância de 0,05, considerando o programa estatístico XLStat versão 2014 (Addinsoft, 2014).

5.ARTIGO

PRE AND POSTNATAL EXPOSURE TO THE ORGANOCHLORINE RESIDUES DDT AND ITS DERIVATIVES DOES NOT ALTER MANDIBULAR BONE DENSITY IN RATS

Carolina Schmitt Walker, Sandra Lucinei Balbo.

Carolina Schmitt Walker – Dentist, graduated from the Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE)
Sandra Lucinei Balbo – Ph.D., Professor in the Master's and Doctoral Program in Biosciences and Health at the
Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

ABSTRACT

Introduction: The widespread use of pesticides in agriculture, combined with the long decomposition time of some byproducts, has posed environmental and public health challenges. Recent epidemiological studies have linked pre- and postnatal exposure to organochlorine pesticides and various health problems. However, limited research has explored the impact of low-dose exposure of the organochlorine pesticide DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane) and its residues on mineralogical properties and bone density, particularly across generations. **Methodology:** After confirming pregnancy, the female rats were divided into four groups (n=6/group) during gestation and lactation. The control group received tap water *ad libitum*, while the other groups received water containing the following organochlorine pesticide residues: the Dichlorodiphenyldichloroethane (DDD) group received water with DDD (0.0147 μM ; 0.0047 mg/L), and the Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) group received water with DDE (0.0056 μM ; 0.0018 mg/L). The offspring (F1 generation) continued receiving water formulations with the respective DDT residue patterns for each group (Control, DDD, DDE). The F2 generation, derived from the F1 generation, was also exposed to identical DDT residue concentrations. Evaluations of the F1 and F2 generations were conducted at 35 postnatal days (PND35) and 105 postnatal days (PND105). After euthanasia, the mandibles were collected and subsequently subjected to computed tomography to assess bone density.

Results: In the F1 generation, no significant differences in bone density were observed between the Control, DDD, and DDE groups at 35 days. However, in the F2 generation, the DDE group showed a reduction in the Mandibular Panoramic Index (IMP) compared to the control and DDD groups at 35 days. By 105-day-old animals, no statistically significant differences in mandibular bone density were found between the Control, DDD, and DDE groups in either generation.

Conclusion: Pre- and postnatal exposure to low concentrations of DDT residues and their derivatives does not result in significant changes in mandibular bone density in rats in the first and second generations. These findings suggest that, at the evaluated doses, DDT exposure may not have a substantial transgenerational impact on bone density in this experimental model.

Keywords: *Pesticides, mandibular density, transgenerational.*

1. INTRODUCTION

The increasing use of pesticides has led to a range of environmental and public health issues (Al Antary, 2021; Dutra & Ferreira, 2017). Although these products are developed following safety criteria, there is evidence that exposure to them is associated with the development of cardiovascular and neurological diseases,

reproductive dysfunctions, metabolic disorders, skeletal and muscular alterations, and congenital anomalies (Kalliora *et al.*, 2018; Teodoro *et al.*, 2019).

Organochlorine pesticides were developed in the 1930s, with Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) being the main representative of this class (Klaassen, 2013). Its degradation products include Dichlorodiphenyldichloroethane (DDD) and Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) (Carrizo *et al.*, 2017; Eskenazi *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2020; Klaassen, 2013; Mansouri *et al.*, 2017; Vall *et al.*, 2014). DDT is notable for its high persistence in the environment, where it can remain for long periods in soil, water, and organisms, even after its application. Studies indicate that exposure to DDT and its residues can cause cytotoxic (Pérez-Maldonado *et al.*, 2005), nephrotoxic (Marouani *et al.*, 2017), hepatotoxic (Migliaccio *et al.*, 2019), neurotoxic, and reproductive effects (Marouani *et al.*, 2017), as well as endocrine and metabolic dysfunctions (Pestana *et al.*, 2017).

Although research on the impact of organochlorine pesticides on bone density remains limited; some studies suggest a possible relationship between this exposure and bone health deterioration (Cano-Sancho *et al.*, 2017; Kalliora *et al.*, 2018; Góralczyk & Majcher, 2019; Mamane *et al.*, 2015). Bone density assessment is essential for diagnosing skeletal health and can be performed using different methodologies, each with technical specificities and precision levels. The mandible is particularly relevant for such analyses because its bone density reliably reflects systemic bone metabolism and is sensitive to dysfunctions caused by chemical substances. Its composition—consisting of cortical and trabecular bone—allows a detailed analysis of the effects of organochlorines on different bone structures. Despite anatomical differences between species, the rat mandible has histological similarities to the human mandible, making it a valuable model for studying the impacts of chemical exposure on bone density and quality (Beard *et al.*, 2006; Glynn *et al.*, 2000; Castro, 2016; Sindeaux *et al.*, 2014; Rignell-Hydbom *et al.*, 2009).

Recent findings indicate that epigenetics plays a fundamental role in bone health formation and maintenance, being influenced by environmental factors such as pesticide and endocrine disruptor exposure. These agents activate intracellular signaling pathways that modulate gene expression, affecting bone mineralization and quality. Organochlorine pesticides, in particular, act as endocrine disruptors by interfering with hormonal balance, including estrogen and vitamin D pathways, both essential for bone health. These changes can lead to DNA methylation modifications, hormonal dysregulation, and inflammatory responses that compromise bone density and structure. Furthermore, multigenerational studies suggest that environmental exposures during childhood can impact not only directly exposed individuals but also future generations through hereditary epigenetic modifications such as DNA methylation and histone alterations, affecting bone cell differentiation and bone matrix maintenance (Beard *et al.*, 2000; Bianco-Miotto *et al.*, 2017; Cano-Sancho *et al.*, 2017; Cluett *et al.*, 2019; Kubota *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2024; Malcom & Valcarcel, 2023; Pizzorno & Pizzorno, 2021; Science Direct, 2024).

Few studies demonstrate the relationship between exposure to low doses of DDT and its residues and mineralogical changes and bone density (Glynn *et al.*, 2000; Wallin *et al.*, 2005). Preliminary data from an ongoing study in Santa Tereza do Oeste, Paraná, indicate that only organochlorine pesticides DDT and its derivatives (DDE and DDD) were above the quantification limit in the analyzed soil. In this context, the objective of this study was to evaluate transgenerational mandibular bone density in pubertal and adult rats subjected to pre- and postnatal exposure to low concentrations of organochlorine residues, specifically DDT derivatives.

2. METHODOLOGY

2.1 Experimental Design

The experiment followed a completely causal design with a quadruple factorial scheme (DDD, DDE, age, and generation). It was conducted with 36 albino Wistar rats, including 24 females and 12 males, aged 8 weeks, nonconsanguineous, which were mated and designated as the parental generation. Subsequently, the study was carried out with the offspring (F1 generation) of this parental generation and with the descendants of the F1 generation (F2 generation).

2.2 Formulation of Water with Trace Concentrations of DDT Residues

The pesticide standards, 1,1-Dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (p,p'DDD) and 2,2-Bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene (p,p'-DDE), purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), were dissolved in ethyl alcohol (99.5° GL, Sigma Chemical Co.) to prepare the stock solutions of DDD and DDE, at concentrations previously found in the soil of a region in western Paraná. The solutions were kept refrigerated at 4°C and protected from light throughout the experiment.

From these stock solutions, pesticides were added to potable water to obtain trace concentrations of DDD (0.0147 µM; 0.0047 mg/L) and DDE (0.0056 µM; 0.0018 mg/L), which were provided ad libitum to the animals according to the experimental design. For standardization purposes, the final volume of ethyl alcohol used as a vehicle in all groups was adjusted to 0.01% (Pestana *et al.*, 2017).

2.3 Animals

Albino Wistar rats were supplied by the Central Animal Facility of the State University of Western Paraná (Unioeste) and housed in the Sectoral Animal Facility of the Laboratory of Biological Investigations (LinBio) at the same institution. The animals were kept in polypropylene cages at 22°C (±2°C) in an environment with a 12-hour light/dark cycle and air exhaust system, receiving a standard rodent diet and potable water ad libitum.

The experimental protocol followed the guidelines established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of Unioeste.

2.3.1 Parental Generation

After an acclimatization period of 10 to 14 days in the Sectoral Animal Facility of the Laboratory of Biological Investigations (LinBio), the 36 rats at 70 postnatal days (PND70) were housed for mating (at a ratio of 2 females:1 male) and kept together for 5 days (the duration of the estrous cycle). Pregnancy confirmation (gestational day 0, PG0) was determined by the presence of spermatozoa in vaginal smears.

On PG0, the pregnant rats were divided into four groups (n=6/group), as follows:

- Control group: Provided tap water ad libitum;
- DDD group: Provided tap water ad libitum containing DDD (0.0147 µM; 0.0047 mg/L);
- DDE group: Provided tap water ad libitum containing DDE (0.0056 µM; 0.0018 mg/L).

To determine the effect of DDT residues on the offspring of the exposed rats during the pre- and postnatal periods, the respective tap water formulations were provided ad libitum from PG0 (21-day prenatal period) and throughout the entire lactation period (21 postnatal days).

At the end of the lactation period, the parental generation rats were euthanized using an overdose of anesthetics (Ketamine 300 mg/kg and Xylazine 45 mg/kg). The offspring of the parental generation were designated as the F1 generation.

2.3.2 Descendant Generations (F1 and F2)

After weaning (PND22), the offspring were sexually differentiated. The three groups of the F1 generation (Control, DDD, DDE) contained a standardized number of 6 males and 15 females.

The F1 generation received the same treatment protocol previously described for the parental generation, with the continuous administration of water formulations containing the respective DDT residue concentrations according to their respective groups (Control, DDD, DDE) throughout development.

The F2 generation followed the same treatment protocol as the F1 generation, maintaining the administration of water formulations with the respective DDT residue concentrations according to their groups (Control, DDD, DDE) throughout development (Figure 1).

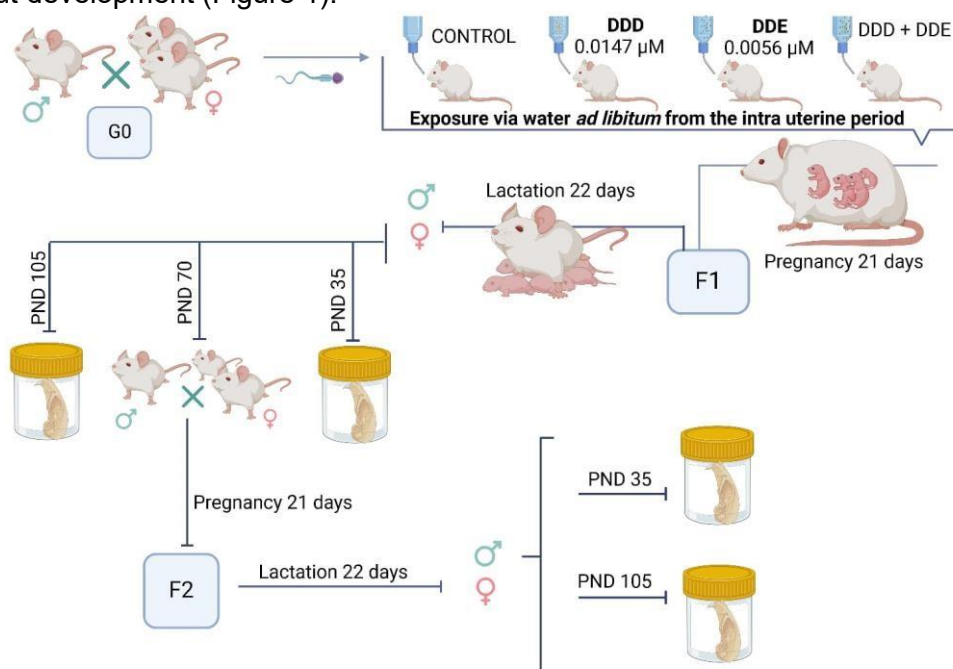


Figure 1– Schematic Experimental Design: The schematic represents the experimental design involving DDT residues (DDD and DDE), including the control and combined (DDD + DDE) groups. The parental generation (G0) was exposed to water containing residues from the intrauterine period (21-day gestation) through lactation (22 days). The offspring (F1) were sex-separated at weaning (PND22) and continued under the same exposure protocol throughout development. The F2 generation, descendants of F1, followed the same treatment. Analyses were conducted at different postnatal ages (PND35 and PND105).Source: BioRender

2.4 Evaluation of Descendant Generations (F1 and F2)

At 35 postnatal days (PND35) and 105 postnatal days (PND105), at each euthanasia, the following variables were evaluated: number of live and dead pups per female, birth weight, male-to-female ratio per litter, and body weight on the day of euthanasia. The mandibles were collected and subsequently

subjected to computed tomography scans to assess bone density. Computed tomography scans were obtained using the Orthopantomograph TM OP300 device (Figure 2), with an FOV of 61×48 mm, using 90 kV, 10 mA for 13 seconds, exposing the specimen to 1062 mGycm², generating 300 images, which were viewed and analyzed using RadiAnt DICOM Viewer software.

Five regions of interest were evaluated, three points of interest in the mandibular trabecular bone and two in the mandibular cortical bone, as proposed by Sindeaux et al. (2014). The Mandibular Cortical Index (MCI) represents the mandibular cortical index used in panoramic radiographs. The mandibular cortical analysis is performed from sagittal images, visually assessed distal to the mental foramen, bilaterally, and classified according to Klementi's classification (Figure 3). This measurement is performed bilaterally, and the mean is used in the analysis (Castro, 2016).

The Mental Cortical Thickness (MCT) represents the thickness of the mandibular cortex in the mental foramen region, as described by Ledgerton *et al.*, 1997, and is measured by the thickness of the mandibular cortex along a line perpendicular to two parallel lines delimiting the mandibular cortex in the mental foramen region (Figure 4). This measurement is also evaluated bilaterally, and the mean is used in the analysis (Source: Castro, 2016).

Finally, the Superior (S) and Inferior (I) Mental Panoramic Index (MPI) represents the mandibular panoramic index used in panoramic radiographs, being the ratio between the thickness of the mandibular cortex and the distance between the opening of the mental foramen (superior and inferior) and the inferior mandibular cortex (Figures 6 and 7). In this analysis, the total index (superior + inferior) was used (Castro, 2016).

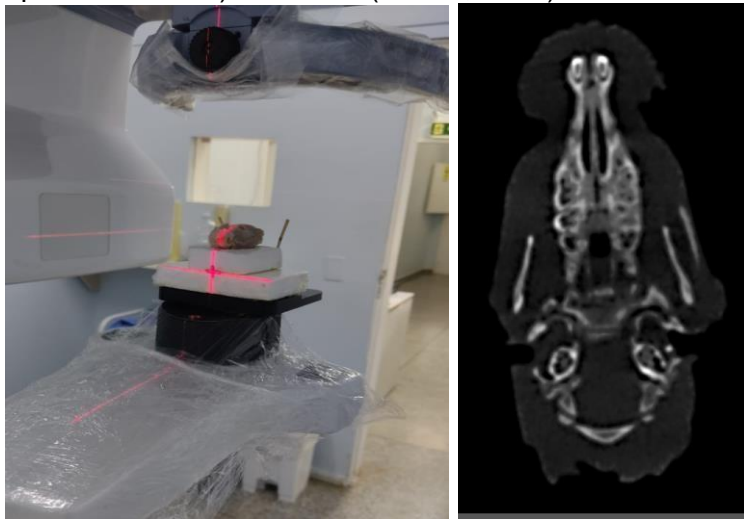


Figure 2. Orthopantomograph™ OP300, with a Field of View (FOV) of 61 × 48 mm, using 90 kV, 10 mA for 13 seconds, exposing the sample to 1062 mGycm² and generating 300 images.

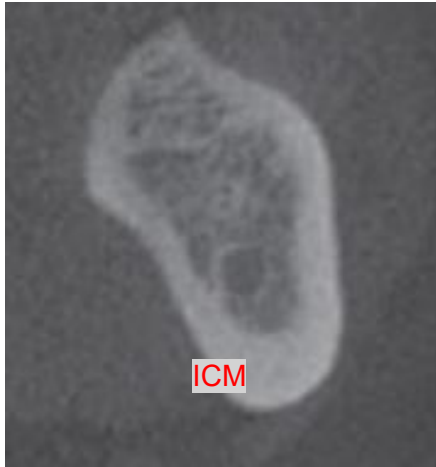


Figure 3. ICM (Mandibular Cortical Index): The Mandibular Cortical Index (IMC) is used in panoramic radiographs to assess the mandibular cortex based on sagittal images. The evaluation is conducted bilaterally, distal to the mental foramen, through visual inspection and classified according to Klementi's classification. Source: Castro, 2016.

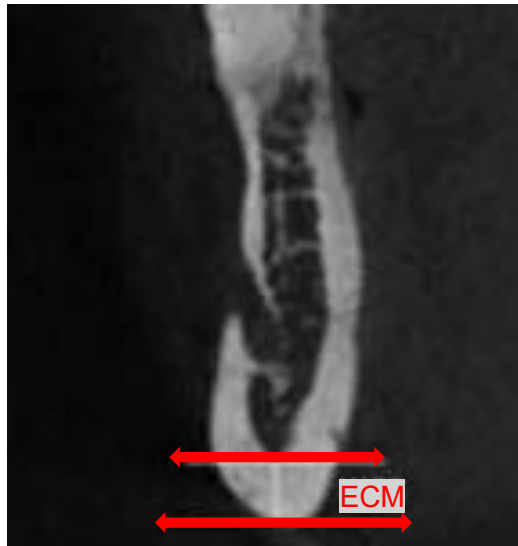
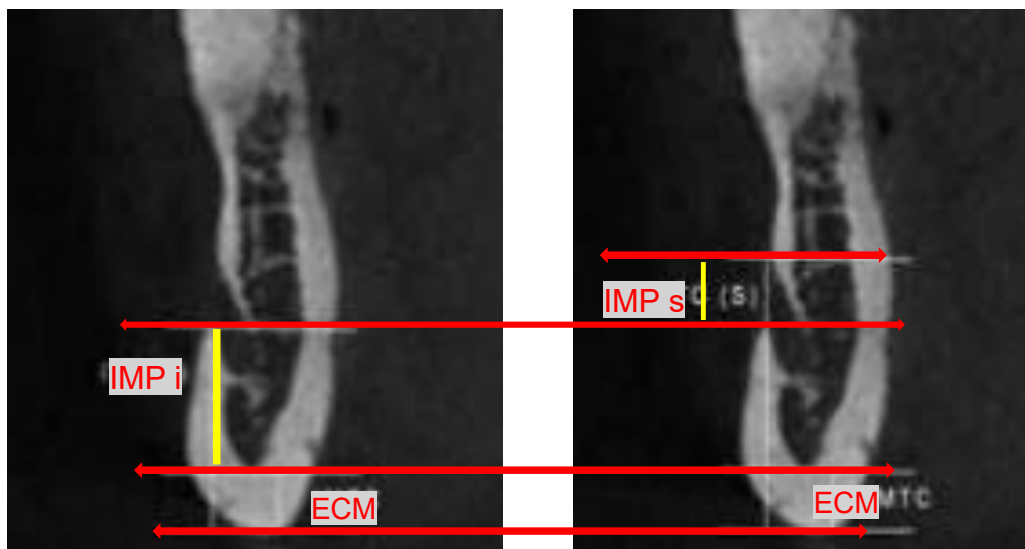


Figure 4. ECM (Mental Cortical Thickness): Represents the mandibular cortical thickness in the region of the mental foramen, as described by Ledgerton et al., 1997. It is measured by the thickness of the mandibular cortex along a line perpendicular to two parallel lines that delineate the mandibular cortex in the mental foramen region. Source: Castro, 2016.



Figures 5 and 6. Superior (S) and inferior (I) IMP, representing the Panoramic Mandibular Index (IMP) used in panoramic radiographs. The IMP is defined as the ratio between the thickness of the mandibular cortex and the distance between the opening of the mental foramen (superior and inferior) and the inferior mandibular cortex. Source: Castro, 2016.

2.5 Statistical Analysis

The variables obtained were statistically analyzed after verifying the assumptions of normality (MCW Test and FD calculations). Considering these factors and their respective levels, if the statistical assumptions were met, Factorial Analysis of Variance (ANOVA) was performed, followed by the LSD Fisher test in cases of statistical significance ($p < 0.05$). If the statistical assumptions were not met, the Generalized Linear Model (GLM) was applied using the Gamma distribution. All analyses were conducted at a 0.05 significance level, using the XLStat software, version 2014 (Addinsoft, 2014).

3.RESULTS

3.1 Final Weight Evaluation

It can be observed in Table 1 that exposure to DDD and DDE did not influence the final body weight of the F1 generation. This parameter was similar among the three groups studied, both in pubertal females and pubertal males. There was also no difference in final body weight among adult females or among adult males.

Table 1 - Final weight of female and male rats at pubertal (PND35) and adult (PND105) ages in the F1 generation.

FINAL WEIGHT F1	PUBERTS	PUBERTS	ADULTS	ADULTS
	(PND35)	(PND35)	(PND105)	(PND105)
	FEMEALE	MALE	FEMEALE	MALE
CTL	93,71±3,60	113,00±4,62	223,40±2,30	329,50±12,10
DDD	100,30±5,49	115,00±9,90	225,30±5,00	334,20±9,60
DDE	97,00±2,11	117,00±2,70	227,90±6,40	343,00±6,60

Data are the mean $\pm$ SEM. * $p \leq 0.05$ (Student's t-test). No statistically significant differences were identified in final body weight when comparing the Control, DDD, and DDE groups among pubertal female rats (PND35) of the

F2 generation, as well as in the analysis of adult female rats (PND105) of the same generation. Similarly, when evaluating pubertal male rats (PND35) of the F2 generation, no statistically relevant variation was observed among the Control, DDD, and DDE groups, a pattern that was also observed in adult male rats (PND105) of the F2 generation.

Table 2 - Final weight of female and male rats at pubertal (PND35) and adult (PND105) ages in the F2 generation.

FINAL WEIGHT F2	PUBERTS	PUBERTS	ADULTS	ADULTS
	(PND35)	(PND35)	(PND105)	(PND105)
	FEMALE	MALE	FEMALE	MALE
CTL	98,33±4,68	93,17±2,38	226,90±4,17	350,70±8,09
DDD	94,88±4,56	84,10±9,54	221,60±6,50	344,50±9,55
DDE	94,00±5,21	105,70±5,64	218,00±2,26	347,80±6,31

Data are the mean ± SEM. * $p \leq 0.05$ (Student's t-test).

3.2 Mandibular Bone Density Evaluation

Figure 7 shows that the ICM (A), ECM (B), and IMP (C) were similar among the CTL, DDD, and DDE groups in pubertal animals of the F1 generation at 35 days of life, as well as in adults at 105 days (Figures D, E, and F). The measurements evaluated in pubertal animals of the F1 generation are represented in Figure 8, while those of adult animals are shown in Figure 9.

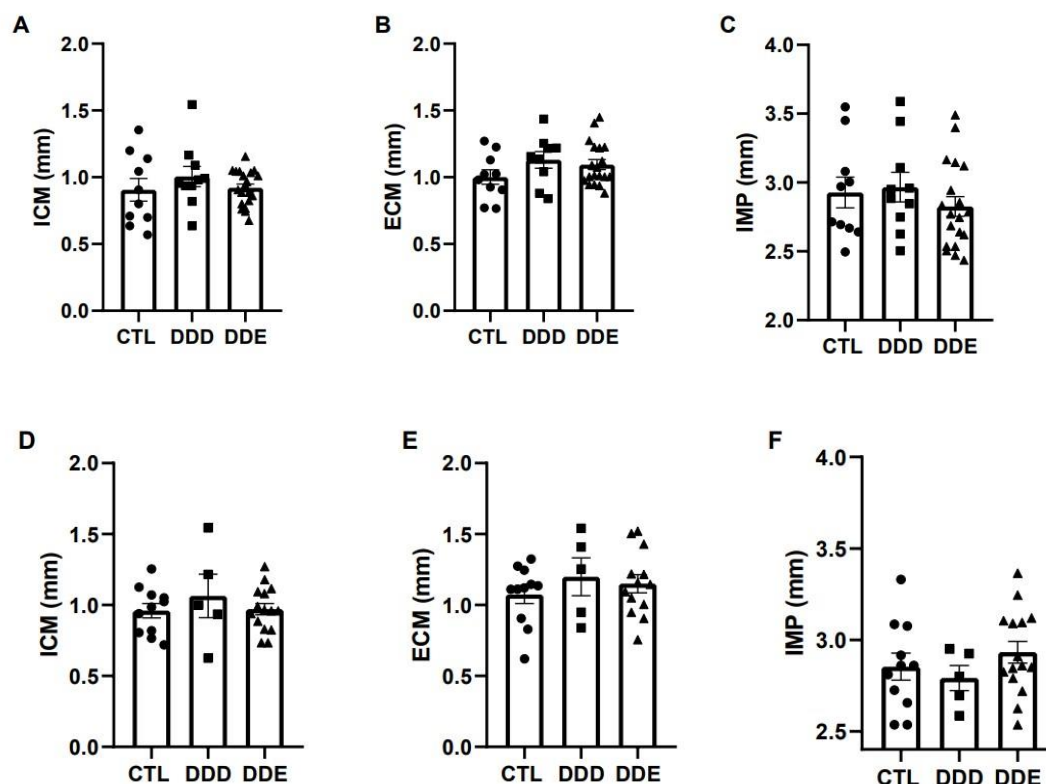


Figure 7- Evaluation of pre- and postnatal exposure to DDD and DDE in the F1 generation of pubertal rats at 35 days of age on ICM (A), ECM (B), and IMP (C), and in the F1 generation of adult rats at 105 days on ICM (D), ECM (E), and IMP (F).

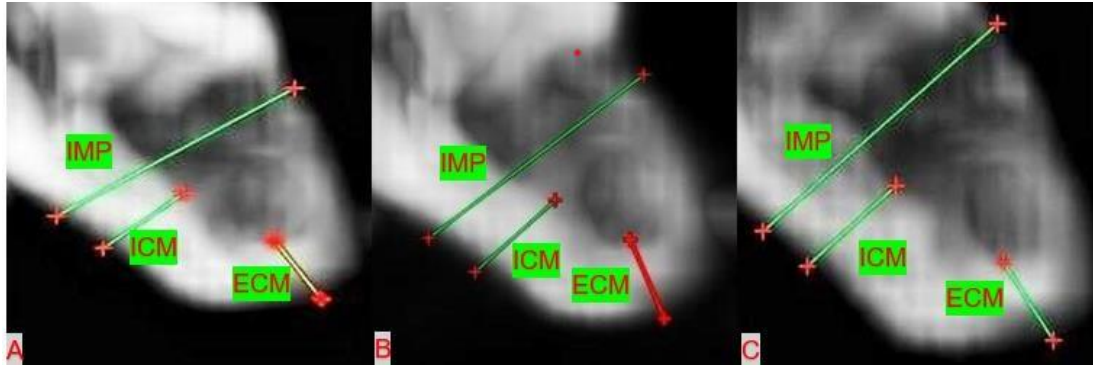


Figure 8. Evaluation of pre- and postnatal exposure to DDD and DDE on ICM, ECM, and IMP measurements in pubertal F1 generation rats: CTL (A), DDD (B), and DDE (C) at 35 days of life.

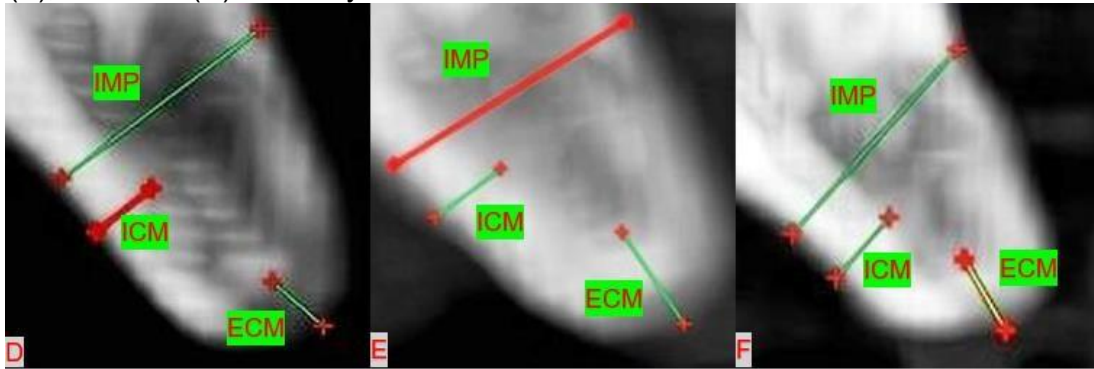


Figure 9. Evaluation of pre- and postnatal exposure to DDD and DDE on ICM, ECM, and IMP measurements in adult F1 generation rats: CTL (A), DDD (B), and DDE (C) at 105 days of life.

Figure 10 shows that pubertal rats of the F2 generation exposed to DDE exhibited a reduction in the IMP (C) compared to the CTL and DDD groups. However, the ICM (A) and ECM (B) were similar among the CTL, DDD, and DDE groups in pubertal animals of the F2 generation at 35 days. The adult animals of the F2 generation showed similar ICM (D), ECM (E), and IMP (F) among the three studied groups. The measurements of pubertal F2 generation animals are represented in Figure 11, while those of adult animals are shown in Figure 12.

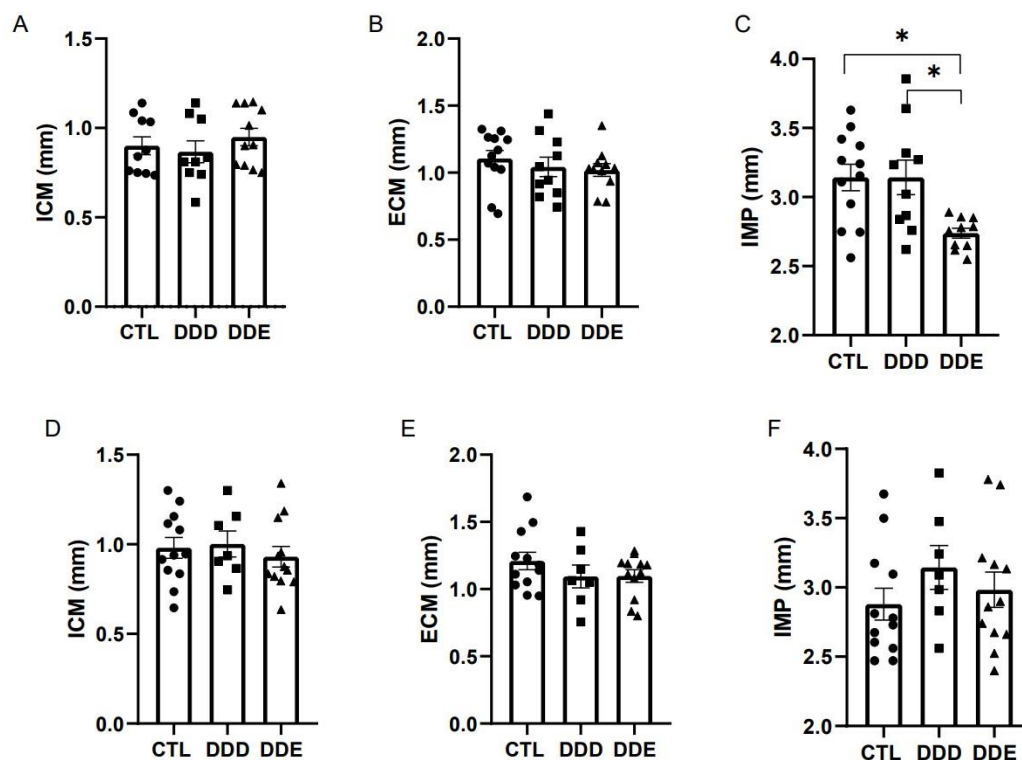


Figure 10. Evaluation of pre- and postnatal exposure to DDD and DDE in the F2 generation of pubertal rats at 35 days of age on ICM (A), ECM (B), and IMP (C), and in the F2 generation of adult rats at 105 days on ICM (D), ECM (E), and IMP (F).

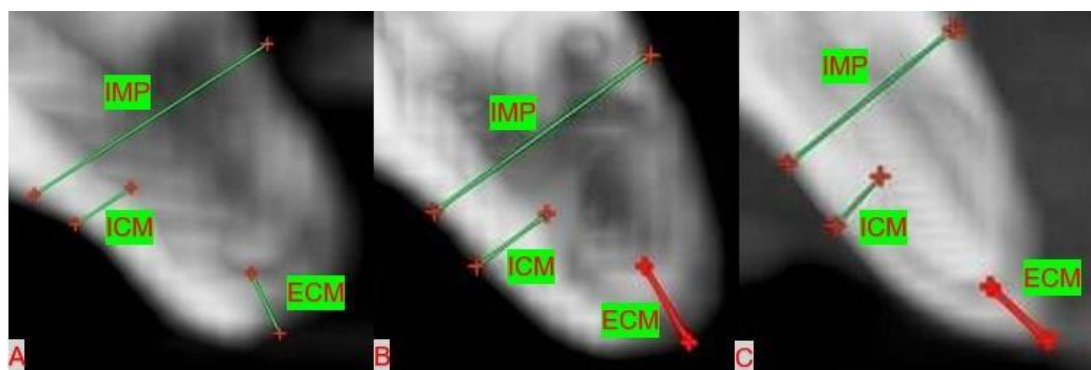


Figure 11. Evaluation of pre- and postnatal exposure to DDD and DDE on ICM, ECM, and IMP measurements in pubertal F2 generation rats: CTL (A), DDD (B), and DDE (C) at 35 days of life.

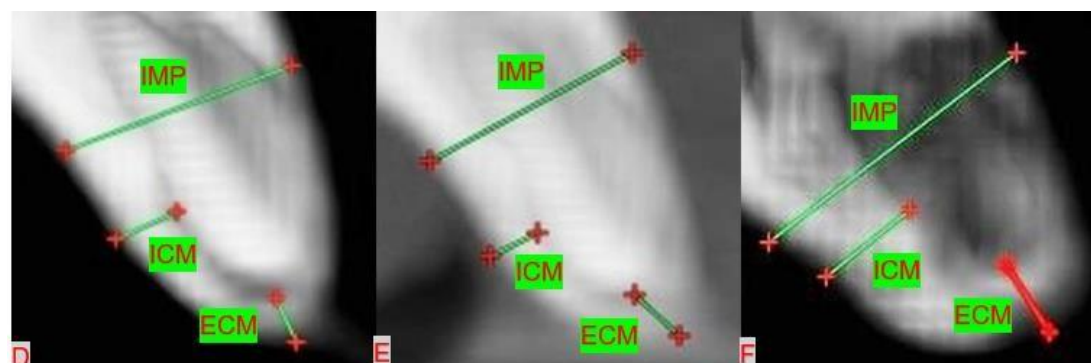


Figure 12. Evaluation of pre- and postnatal exposure to DDD and DDE on IMC, ECM, and IMP measurements in adult F1 generation rats: CTL (A), DDD (B), and DDE (C) at 105 days of life.

4. DISCUSSION

The findings of this study provide relevant information on the impacts of exposure to the metabolites of the organochlorine pesticide DDT (DDD and DDE) on the mandibular bone density of Wistar rats, evaluating two generations (F1 and F2) at different developmental stages: pubertal (35 days) and adult (105 days).

Based on the analysis of mandibular bone density using the ICM and ECM as references, no significant differences were observed between the Control, DDD, and DDE groups in both generations and ages. These findings suggest that, at the evaluated concentrations, exposure to DDT metabolites did not have a significant impact on mandibular cortical thickness or bone density in the short and medium term. These results are consistent with Rignell-Hydbom *et al.* (2009), who indicate that exposure to low doses of organochlorine pesticides may not generate detectable changes in specific bone parameters, especially in short-term exposure. Beard *et al.* (2006) also report that adverse impacts on bone density depend on higher cumulative doses and the duration of exposure, justifying the absence of effects at trace concentrations, such as those used in this study.

Previous studies demonstrate that the toxicity of organochlorine compounds may depend on the route of exposure, dose, and evaluated developmental period. Wallin *et al.* (2005) indicate that sub-threshold doses of DDD and DDE are not sufficient to trigger detectable metabolic changes in bone mineral density. Pestana *et al.* (2017) suggest that low concentrations of pesticides may not significantly interfere with bone density in the short term, especially in controlled exposures. Furthermore, Baccarelli & Bollati (2011) highlight that significant epigenetic alterations depend not only on the type of chemical compound but also on the dose and duration of exposure, which may explain the absence of detectable changes in mandibular bone tissues. Multigenerational studies demonstrate that the effects of organochlorine compounds may manifest across different generations due to epigenetic mechanisms. Skvortsova *et al.* (2018) point out that epigenetic modifications resulting from exposure to DDT and its metabolites can be transmitted to subsequent generations, affecting various physiological parameters. In the present study, a slight reduction in the IMP was identified in the DDE group of the F2 generation at 35 days, suggesting a possible influence of this metabolite on trabecular mandibular bone density in early developmental stages. Although this difference was observed, its biological relevance should be interpreted with caution, as the impacts of organochlorines on bone density are generally more evident in prolonged exposures and at higher cumulative doses (Beard *et al.*, 2006; Cano-Sancho *et al.*, 2017).

The literature indicates that organochlorine compounds may act as endocrine disruptors, interfering with hormonal processes essential for bone homeostasis, including those regulated by estrogen and vitamin D (Beard *et al.*, 2006; CanoSancho *et al.*, 2017). These effects are more pronounced in metabolically active bone tissues, such as trabecular bone, supported by Wallin *et al.* (2005), who report that compounds such as DDE may affect trabecular bone quality due to alterations in hormonal balance. Kalliora *et al.* (2018) also suggest that exposure to DDE may be associated with changes in

bone density during early developmental stages, which may align with the slight reduction observed in the IMP in the F2 generation.

Despite these evidences, the findings of this study indicate that exposure to trace concentrations of DDD and DDE under the evaluated conditions did not promote significant changes in mandibular bone density in most of the analyzed parameters. This reinforces that, although organochlorines may impact bone quality, adverse effects may depend on factors such as dose, duration of exposure, and the presence of concurrent environmental factors, such as diet and exposure to other chemical compounds (Pestana *et al.*, 2017). Some limitations should be considered when interpreting the results, such as the sample size, which, although adequate for statistical analysis, could be expanded to increase the robustness of the findings. Additionally, anatomical and physiological differences between rats and humans may limit the direct extrapolation of results to human populations. This reduction in IMP may indicate a transgenerational effect of DDE, as it was observed only in the second generation (F2) and not in the first generation (F1). This finding is significant because it suggests that exposure to low concentrations of organochlorine residues, such as DDE, may have cumulative or latent impacts that manifest in subsequent generations, even if they are not evident in the initially exposed generation (Miller *et al.*, 2017). However, it is important to highlight that at 105 days postnatal, no significant differences in mandibular bone density were observed among the control, DDD, and DDE groups in either generation (F1 and F2). This indicates that although there may be a transient or specific effect at a certain stage of development (such as at 35 days), exposure to DDT residues and its derivatives, at the concentrations evaluated, does not cause lasting or significant changes in mandibular bone density in rats (Miller *et al.*, 2017).

Therefore, the decrease in IMP in the F2 generation at 35 days may be related to DDE exposure, suggesting a possible transgenerational impact of this residue on bone development at a specific stage. However, the absence of significant differences at later stages (105 days) indicates that this effect may be temporary or compensated over time. Environmental exposures during critical periods of development can induce stable epigenetic changes that are transmitted through the germline, impacting phenotypes in subsequent generations, as described by Skinner (2011). In this context, the reduction of IMP in the F2 generation may reflect an epigenetic modification induced by exposure to DDE during early development, which only manifested in the second generation. This phenomenon is consistent with the idea that environmental epigenetics can influence developmental biology and susceptibility to physiological changes, such as bone density, in future generations. These critical windows of exposure allow an environmental factor to permanently modify an epigenome, which then continues throughout development to impact genetic programming, resulting in a modified adult epigenome and genome activity (transcriptome). This promotes susceptibility to disease development or creates increased biological variation in the phenotype, which may facilitate an adaptive event and influence natural selection. This reduction in IMP may indicate a transgenerational effect of DDE, as it was observed only in the second generation (F2) and not in the first (F1). This finding is relevant because it suggests that exposure to low concentrations of organochlorine residues, such as DDE, may have cumulative or latent impacts that manifest in subsequent generations, even if they are not evident in the initially exposed Generation (Miller *et al.*, 2017).

However, it is important to highlight that at 105 days postnatal, no significant differences were observed in mandibular bone density among the control, DDD, and DDE groups in either generation (F1 and F2). This indicates that, although there may be a transient or phase-specific effect during development (such as at 35 days), exposure to DDT residues and its derivatives at the evaluated concentrations does not result in long-lasting or significant changes in mandibular bone density in rats.

Therefore, the reduction in IMP in the F2 generation at 35 days may be related to DDE exposure, suggesting a possible transgenerational impact of this compound on bone development during a specific developmental window. However, the absence of significant differences at later stages (105 days) indicates that this effect may be temporary or compensated over time. These results reinforce the need for further studies to understand the underlying mechanisms and potential long-term effects of exposure to organochlorine pesticides—especially at low doses—on bone health and other health outcomes (Miller *et al.*, 2017).

The literature indicates that organochlorine compounds may act as endocrine disruptors, interfering with hormonal processes essential for bone homeostasis, including those regulated by estrogen and vitamin D (Beard *et al.*, 2006; Cano-Sancho *et al.*, 2017). These effects are more pronounced in metabolically active bone tissues, such as trabecular bone, supported by Wallin *et al.* (2005), who report that compounds such as DDE may affect trabecular bone quality due to alterations in hormonal balance. Kalliora *et al.* (2018) also suggest that exposure to DDE may be associated with changes in bone density during early developmental stages, which may align with the slight reduction observed in the IMP in the F2 generation. Despite these evidences, the findings of this study indicate that exposure to trace concentrations of DDD and DDE under the evaluated conditions did not promote significant changes in mandibular bone density in most of the analyzed parameters.

This reinforces that, although organochlorines may impact bone quality, adverse effects may depend on factors such as dose, duration of exposure, and the presence of concurrent environmental factors, such as diet and exposure to other chemical compounds (Pestana *et al.*, 2017). Some limitations should be considered when interpreting the results, such as the sample size, which, although adequate for statistical analysis, could be expanded to increase the robustness of the findings. Additionally, anatomical and physiological differences between rats and humans may limit the direct extrapolation of results to human populations.

The results of this research highlight the importance of continuous monitoring of the effects of persistent organochlorine compounds in the environment and their consequences for bone health, particularly in the context of multigenerational exposures. Given these findings, further studies are recommended to investigate the epigenetic mechanisms involved in the multigenerational effects of DDT and its metabolites, as well as research using different concentrations and exposure durations to better evaluate dose-response relationships.

5. CONCLUSION

Pre- and postnatal exposure to organochlorine residues of DDT and its derivatives, at the evaluated concentrations, does not cause significant changes in mandibular bone density in rats of the first and second generations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support provided by Cardiff University through the Global Challenges Research Fund (GCRF). This funding significantly contributed to the study's design, data collection, analysis, and manuscript preparation. The authors declare that the funding agency had no influence on the interpretation of the results or the decision to publish this research.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Carolina Schmitt Walker developed the research and drafted the manuscript. Sandra Lucinei Balbo supervised the research.

ETHICAL PPROVAL



Autorização

O Protocolo nº 21-20 intitulado “Avaliação dos efeitos crônicos da exposição a metabólitos do DDT (DDD e DDE) em diferentes gerações de ratos Wistar (F1 e F2)”, sob a responsabilidade de **Ana Tereza Bittencourt Guimarães** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 20/11/2020. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	18/01/2021 a 12/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico <i>Wistar</i>
N. de animais	08 M - 16 F = 24
Peso/idade	150-200 g - 8 semanas de vida
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da Unioeste

Cascavel, 23/11/2020

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3126/2018-GRE

REFERENCES

- ALANTARY, T. M., ALAWI, M. A., KIWAN, R., HADDAD, N. A. (2021) Residues of organochlorine pesticides in food of animal origin from northern governorates of Jordan in 2019 and 2020. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **106**. 23262332.
- BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr*, v. **21**, n. 2, p. 243–251, 2011.
- BEARD, J., MARSHALL, S., JONG, K. (2000). 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(pchlorophenyl)-ethane (DDT) and reduced bone mineral density. *Arch Environ Health* **55**. 177-180.
- BEARD, J. et al. 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (DDT) and reduced bone mineral density. *Archives of Environmental Health*, v. 55, p. 177-180, 2006.
- BIANCO-MIOTTO, T. et al. Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2017.
- CANO-SANCHO G, SALMON AG, LA MERRILL MA. Association between Exposure to p,p'-DDT and Its Metabolite p,p'-DDE with Obesity: Integrated Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect*. 2017 Sep 18;125(9):096002. doi: 10.1289/EHP527. PMID: 28934091; PMCID: PMC5915185.
- CARRIZO, D., ANNA, S., JOAN, A. S., ÖRJAN, G. (2017). Spatial Distributions of DDTs in the Water Masses of the Arctic Ocean. *Environmental Science & Technology* **51**. 7913-7919.
- CASTRO, J.G.K. Analysis of the mandibular cortex in cone beam computed tomography: a study in postmenopausal women. 2016. Dissertation (Master's in Health Sciences) – University of Brasília, Brasília, 2016.
- CLUETT, R., SESHASAYEE, S. M., ROKOFF, L. B., RIFAS-SHIMAN, S. L., YE, X. Y., CALAFAT, A. M., GOLD, D. R., COULL, B., GORDON, C. M., ROSEN, C. J., OKEN, E., SAGIV, S. K., FLEISCH, A. F. (2019). Per- and polyfluoroalkyl substance plasma concentrations and bone mineral density in midchildhood: a cross-sectional study (Project Viva, United States). *Environ Health Perspect*.
- DUTRA, L. S., FERREIRA, A. P. (2017) Associação entre malformações congênitas e a utilização de agrotóxicos em monoculturas no Paraná, Brasil. *Saúde debate*, Rio de Janeiro **41**. 241-253.
- ESKENAZI, B.; RAUCH, S. A.; TENERELLI, R.; HUEN, K.; HOLLAND, N. T.; LUSTIG, R. H.; KOGUT, K.; BRADMAN, A.; SJODIN, A.; HARLEY, K. G. In utero and childhood DDT, DDE, PBDE and PCBs exposure and sex hormones in adolescent boys: The
- CHAMACOS Study. *Environmental Health Perspectives*, v. 125, n. 9, p. 097004, 2016.
- FERREIRA, V. B., FONTES, L. E., GUZZON, M. R. A., GALLISTL, C. (2020). Residues of legacy organochlorine pesticides and DDT metabolites in highly consumed fish from the polluted Guanabara Bay, Brazil: distribution and assessment of human health risk. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **55**, 30–41.
- GLYNN, A. W., MICHAËLSSON, K., LIND, P. M., WOLK, A., AUNE, M., ATUMA, S., DARNERUD, P. O., MALLMIN, H. (2000). Organochlorines and bone mineral density in Swedish men from the general population. *Osteoporos*

International **11**, 1036-1042. GÓRALCZYK K, MAJCHER A. Are the civilization diseases the result of organohalogen environmental pollution? *Acta Biochim Pol.* 2019 May 24;66(2):123- 127.

KALLIORA C, MAMOULAKIS C, VASILOPOULOS E, STAMATIADIS GA, KALAFATI L, BAROUNI R, KARAKOUSHI T, ABDOLLAHI M, TSATSAKIS A. (2018). Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities. *Toxicology and Applied Pharmacology* **346**, 58-75.

KLAASSEN, C. D. (2013) Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 8^a Ed. New York. McGraw-Hill Education.

KUBOTA, T.; MIYAKE, K.; HARIYA, N.; MOCHIZUKI, K. Understanding the epigenetics of neurodevelopmental disorders and DOHaD. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2015.

MAMANE, A. et al. Occupational exposure to pesticides and respiratory health. *Eur Respir Rev.* 24, n. 136, p. 306-319, jun. 2015.

MANSOURI, A., CREGUT, M., ABBES, C., DURANT, M., LANDOULSI, A., THOUAND, G. (2017) The Environmental Issues of DDT Pollution and Bioremediation: a multidisciplinary review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **181**, 309-339.

MALCOM, A. J., & VALCARCEL, C. (2023). Microbiota and bone health: Exploring the gut-skeletal axis in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 19(2), 80–95. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00738-x>

MAROUANI, N., HALLEGUE, D., SAKLY, M., BENKHALIFA, M., RHOUMA, K. B., TEBOURBI, O. (2017). Involvement of oxidative stress in the mechanism of p,p'-DDT induced nephrotoxicity in adult rats. *General Physiology And Biophysics* **36**, 309-320. MAROUANI, N., HALLEGUE, D., SAKLY, M., BENKHALIFA, M., RHOUMA, K. B., TEBOURBI, O. (2017). p,p'-DDT induces testicular oxidative stress-induced apoptosis in adult rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* **15**, 1–10.

MIGLIACCIO, V., MIGLIACCIO, V., SCUDIERO, R., SICA, R., LIONETTI, L., PUTTI, R. (2019). Oxidative stress and mitochondrial uncoupling protein 2 expression in hepatic steatosis induced by exposure to xenobiotic DDE and high fat diet in male Wistar rats. *PLoS ONE* **14**, 1–24.

MILLER, M. F. et al. Transgenerational effects of maternal exposure to environmental endocrine disruptors on reproductive and metabolic health of male offspring. *Environmental Health Perspectives*, v. 125, n. 6, p. 067012, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5703187/>. Acesso em: 2 maio 2025.

PÉREZ-MALDONADO, I. N., HERRERA, C., BATRES, L. E., GONZÁLEZ-AMARO, R., DÍAZ-BARRIGA, F., YÁÑEZ, L. (2005). DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environmental Research* **98** 177-184.

PESTANA, D., TEIXEIRA, D., MEIRELES, M., MARQUES, C., NORBERTO, S., SÁ, C. et al. (2017) Adipose tissue dysfunction as a central mechanism leading to dysmetabolic obesity triggered by chronic exposure to p,p'-DDE. *Scientific Reports* **7**, 1–16.

PIZZORNO, J., PIZZORNO, L. (2021). Environmental toxins are a major cause of bone loss. *Integr Med (Encinitas)*, 20(1):10-17.

RIGNELL-HYDBOM, A., SKERFVING, S., LUNDH, T., LINDH, C. H., ELMSTÅHL, S., BJELLERUP, P. et al. (2009). Exposure to cadmium and persistent organochlorine pollutants and its association with bone mineral

density and markers of bone metabolism on postmenopausal women. *Environmental Research* **109**, 991-996.

ScienceDirect (2024). Environmental modulation of epigenetics in osteogenesis.

Retrieved from

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328224000322>

SINDEAUX, R., FIGUEIREDO, P. T. S., MELO, N. S. M., GUIMARÃES, A. T. B., LAZARTE, L., PEREIRA, F. B. *et al.* (2014). Fractal dimension and mandibular cortical width in normal and osteoporotic men and women. *Maturitas* **77**, 142-148. SKVORTSOVA, K.; IOVINO, N.; BOGDANOVIĆ, O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 12, p. 774–790, 2018.

TEODORO, M., BRIGUGLIO, G., FENGA, C., COSTAB, C. (2019). Genetic polymorphisms as determinants of pesticide toxicity: Recent advances. *Toxicology reports* **6**, 564-570.

VALL, O., GOMEZ-CULEBRAS, M., PUIG, C., RODRIGUEZ-CARRASCO, E., BALTAZAR, A. G., CANCHUCAJA, L. *et al.* (2014). Prenatal and postnatal exposure to DDT by breast milk analysis in Canary Islands. *PLoS ONE* **9**, e83831.

WALLIN E, RYLANDER L, JONSSON BA (2005). Exposure to CB-153 and p,p'DDE and bone mineral density and bone metabolism markers in middle-aged and elderly men and women. *Osteoporosis international* **16**, 2085-2094.

DEFINITIONS, ACRONYMS, ABBREVIATIONS

CLT – Control

DDT – Dichlorodiphenyltrichloroethane

DDE – Dichlorodiphenyldichloroethane

DDD – Dichlorodiphenyldichloroethylene

ECM – Mental Cortical Thickness

FOV – Field of View

Fund LinBio – Laboratory of Biological Investigations

GCRF – Global Challenges Research Fund

ICM – Mandibular Cortical Index

IMP – Panoramic Mandibular

Index

kV – Kilovolt

mA –

Milliampere

mGycm – Milligray per centimeter

6.CONCLUSÕES FINAIS

Os achados deste estudo fornecem informações relevantes sobre os impactos da exposição aos metabólitos do pesticida organoclorado DDT (DDD e DDE) na densidade óssea mandibular de ratos Wistar, avaliando duas gerações (F1 e F2) em diferentes estágios de desenvolvimento: púberes (35 dias) e adultos (105 dias).

Com base na análise da densidade óssea mandibular, utilizando o ICM e o ECM como referências, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle, DDD e DDE, em ambas as gerações e faixas etárias. Esses resultados sugerem que, nas concentrações avaliadas, a exposição aos metabólitos do DDT não apresentou impacto significativo sobre a espessura cortical mandibular ou densidade óssea no curto e médio prazo. Esses achados são consistentes com Rignell-Hydbom *et al.* (2009), que indicam que a exposição a baixas doses de pesticidas organoclorados pode não gerar alterações detectáveis em parâmetros ósseos específicos, especialmente em exposições de curto prazo. Beard *et al.* (2006) também relatam que os impactos adversos sobre a densidade óssea dependem de doses acumulativas mais elevadas e da duração da exposição, o que justifica a ausência de efeitos em concentrações traço, como as utilizadas neste estudo.

Estudos anteriores demonstram que a toxicidade dos compostos organoclorados pode depender da via de exposição, da dose e do período de desenvolvimento avaliado. Wallin *et al.* (2005) indicam que doses sublimiáres de DDD e DDE não são suficientes para desencadear alterações metabólicas detectáveis na densidade mineral óssea. Pestana *et al.* (2017) sugerem que baixas concentrações de pesticidas podem não interferir significativamente na densidade óssea no curto prazo, especialmente em exposições controladas. Ademais, Baccarelli & Bollati (2011) destacam que alterações epigenéticas significativas dependem não apenas do tipo de composto químico, mas também da dose e do tempo de exposição, o que pode explicar a ausência de alterações detectáveis nos tecidos ósseos mandibulares.

Estudos multigeracionais demonstram que os efeitos dos compostos organoclorados podem se manifestar ao longo de diferentes gerações por meio de mecanismos epigenéticos. Skvortsova *et al.* (2018) apontam que modificações

epigenéticas decorrentes da exposição ao DDT e seus metabólitos podem ser transmitidas às gerações subsequentes, afetando diversos parâmetros fisiológicos. No presente estudo, foi identificada uma leve redução no IMP no grupo DDE da geração F2 aos 35 dias, sugerindo uma possível influência desse metabólito sobre a densidade óssea trabecular mandibular em estágios iniciais do desenvolvimento. Embora essa diferença tenha sido observada, sua relevância biológica deve ser interpretada com cautela, uma vez que os impactos dos organoclorados sobre a densidade óssea são geralmente mais evidentes em exposições prolongadas e com doses cumulativas mais elevadas (Beard *et al.*, 2006; Cano-Sancho *et al.*, 2017).

A literatura indica que os compostos organoclorados podem atuar como desreguladores endócrinos, interferindo em processos hormonais essenciais para a homeostase óssea, incluindo os regulados por estrogênio e vitamina D (Beard *et al.*, 2006; CanoSancho *et al.*, 2017). Esses efeitos são mais pronunciados em tecidos ósseos metabolicamente ativos, como o osso trabecular, o que é corroborado por Wallin *et al.* (2005), que relatam que compostos, a exemplo do DDE, podem afetar a qualidade do osso trabecular devido a alterações no equilíbrio hormonal. Kalliora *et al.* (2018) também sugerem que a exposição ao DDE pode estar associada a alterações na densidade óssea durante estágios iniciais do desenvolvimento, o que pode estar alinhado com a leve redução observada no IMP na geração F2.

Apesar dessas evidências, os achados deste estudo indicam que a exposição a concentrações-traço de DDD e DDE, nas condições avaliadas, não promoveu alterações significativas na densidade óssea mandibular na maioria dos parâmetros analisados. Isso reforça que, embora os organoclorados possam impactar a qualidade óssea, os efeitos adversos podem depender de fatores, como dose, tempo de exposição e presença de fatores ambientais concomitantes, a saber, dieta e exposição a outros compostos químicos (Pestana *et al.*, 2017).

Essa redução no IMP encontrada neste estudo pode indicar um efeito transgeracional do DDE, uma vez que foi observada apenas na segunda geração (F2) e não na primeira (F1). Esse achado é relevante, pois sugere que a exposição a baixas concentrações de resíduos organoclorados, como o DDE, pode ter impactos cumulativos ou latentes que se manifestam em gerações subsequentes,

mesmo que não sejam evidentes na geração inicialmente exposta (Miller *et al.*, 2017).

No entanto, é importante destacar que, aos 105 dias pós-natal, não foram observadas diferenças significativas na densidade óssea mandibular entre os grupos controle, DDD e DDE, em nenhuma das gerações (F1 e F2). Isso indica que, embora possa haver um efeito transitório ou específico de determinada fase do desenvolvimento (como aos 35 dias), a exposição aos resíduos de DDT e seus derivados nas concentrações avaliadas não ocasiona alterações duradouras ou significativas na densidade óssea mandibular em ratos (Miller *et al.*, 2017).

Portanto, a redução no IMP na geração F2, aos 35 dias, pode estar relacionada à exposição ao DDE, sugerindo um possível impacto transgeracional desse composto sobre o desenvolvimento ósseo em uma janela específica do desenvolvimento. Contudo, a ausência de diferenças significativas em fases posteriores (105 dias) indica que esse efeito pode ser temporário ou compensado ao longo do tempo. Exposições ambientais, durante períodos críticos do desenvolvimento, podem induzir alterações epigenéticas estáveis que são transmitidas por meio da linhagem germinativa, impactando fenótipos em gerações subsequentes, conforme descrito por Skinner (2011). Nesse contexto, a redução do IMP, na geração F2, pode refletir uma modificação epigenética induzida pela exposição ao DDE, durante o desenvolvimento inicial, que apenas se manifestou na segunda geração. Esse fenômeno é consistente com a ideia de que a epigenética ambiental pode influenciar a biologia do desenvolvimento e a suscetibilidade a alterações fisiológicas, como a densidade óssea, em gerações futuras. Essas janelas críticas de exposição permitem que um fator ambiental modifique permanentemente um epigenoma, que, então, persiste ao longo do desenvolvimento, impactando o programa genético e resultando em um epigenoma adulto modificado e em atividade genômica (transcritoma) alterada. Isso promove a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças ou cria maior variação biológica fenotípica, o que pode facilitar eventos adaptativos e influenciar a seleção natural.

Algumas limitações devem ser consideradas na interpretação dos resultados, como o tamanho amostral que, embora, adequado para a análise estatística, poderia ser ampliado para aumentar a robustez dos achados. Além disso,

diferenças anatômicas e fisiológicas entre ratos e seres humanos podem limitar a extrapolação direta dos resultados para populações humanas.

Os resultados desta pesquisa reforçam a importância do monitoramento contínuo dos efeitos dos compostos organoclorados persistentes no ambiente e suas consequências para a saúde óssea, particularmente no contexto de exposições multigeracionais. Diante desses achados, recomendam-se novos estudos para investigar os mecanismos epigenéticos envolvidos nos efeitos multigeracionais do DDT e seus metabólitos, bem como pesquisas com diferentes concentrações e tempos de exposição, a fim de melhor avaliar as relações dose-resposta.

Conclui-se, assim, que a exposição pré e pós-natal a resíduos organoclorados do DDT e de seus derivados, nas concentrações avaliadas, não promove alterações significativas na densidade óssea mandibular de ratos das primeiras e segundas gerações.

REFERÊNCIAS

- AL ANTARY, T. M., ALAWI, M. A., KIWAN, R., HADDAD, N. A. (2021) Residues of organochlorine pesticides in food of animal origin from northern governorates of Jordan in 2019 and 2020. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **106**. 23262332.
- ANWAY, M. D. *et al.* Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, **v. 308**, n. 5727, p. 1466–1469, 2005.
- ATSDR. Toxicological Profile for DDT, DDE and DDD Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 2022.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. As bases da ecotoxicologia. 1. Ed. São Paulo, Brasil: 2003.
- BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr*, **v. 21**, n. 2, p. 243–251, 2011.
- BARR, D. B., OLSSON, A. O., WONG, L. Y., UDUNKA, S., BAKER, S. E., WHITEHEAD, R. D., MAGSUMBOL, M. S., WILLIAMS, B. L., NEEDHAM, L. L. (2010). Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: national health and nutrition examination survey 1999– 2002. *Environ Health Perspect*, 118:742–748.
- BEARD, J., MARSHALL, S., JONG, K. (2000). 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (DDT) and reduced bone mineral density. *Arch Environ Health* **55**. 177-180.
- BEARD, J. *et al.* 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (DDT) and reduced bone mineral density. *Archives of Environmental Health*, v. 55, p. 177180, 2006.
- BIANCO-MIOTTO, T. *et al.* Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2017.
- BONEWALD, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), 229–238.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.320>

Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: SINASC [site da Internet] [acesso em 15 de maio de 2023]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvPR.def>

CANO-SANCHO G, SALMON AG, LA MERRILL MA. Association between Exposure to p,p'-DDT and Its Metabolite p,p'-DDE with Obesity: Integrated Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect.* 2017 Sep 18;125(9):096002. doi: 10.1289/EHP527. PMID: 28934091; PMCID: PMC5915185.

CAO-LEI, L.; DE ROOIJ, S. R.; KING, S.; MATTHEWS, S. G.; METZ, G. A. S.; ROSEBOOM, T. J.; SZYF, M. Prenatal Stress and Epigenetics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2017. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2017.05.016.

CARRIZO, D., ANNA, S., JOAN, A. S., ÖRJAN, G. (2017). Spatial Distributions of DDTs in the Water Masses of the Arctic Ocean. *Environmental Science & Technology* **51**. 7913-7919.

CASTRO, J. (2016). Análise da cortical mandibular em tomografias computadorizadas de feixe cônico: estudo em mulheres na pós-menopausa. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016

CHEN, X., GAN, C., ZHU, G., JIN, T. (2013). Benchmark dose for estimation of cadmium reference level for osteoporosis in a Chinese female population. *Food Chem Toxicol*, 55:592–595.

CHIU, W. A. *et al.* Beyond the RfD: Broad application of a probabilistic approach to improve chemical dose–response assessments for noncancer effects. *Environmental Health Perspectives*, v. 126, n. 6, p. 1–14, 2018.

CLUETT, R., SESHASAYEE, S. M., ROKOFF, L. B., RIFAS-SHIMAN, S. L., YE, X. Y., CALAFAT, A. M., GOLD, D. R., COULL, B., GORDON, C. M., ROSEN, C. J., OKEN, E., SAGIV, S. K., FLEISCH, A. F. (2019). Per- and polyfluoroalkyl substance plasma concentrations and bone mineral density in midchildhood: a cross-sectional study (Project Viva, United States). *Environ Health Perspect.*

COLLOTTA, M.; BERTAZZI, P. A.; BOLLATI, V. Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, v. 307, p. 35–41, 2013.

D'AMATO C, TORRES J P M, MALM O. DDT (diclorodifeniltricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental: uma revisão. *Quim Nova* 2012.

DUTRA, L. S., FERREIRA, A. P. (2017) Associação entre malformações congênitas e a utilização de agrotóxicos em monoculturas no Paraná, Brasil. *Saúde debate*, Rio de Janeiro **41**. 241-253.

ESKENAZI, B.; RAUCH, S. A.; TENERELLI, R.; HUEN, K.; HOLLAND, N. T.; LUSTIG, R. H.; KOGUT, K.; BRADMAN, A.; SJODIN, A.; HARLEY, K. G. In utero and childhood DDT, DDE, PBDE and PCBs exposure and sex hormones in adolescent boys: The CHAMACOS Study. *Environmental Health Perspectives*, v. 125, n. 9, p. 097004, 2016.

FERNANDES, C. L. F., VOLCAO, L. M., RAMIRES, P.F., MOURA, R. R., SILVA, J. F. M. R. (2020). Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts* **22**, 256- 270.

FERREIRA, V. B., FONTES, L. E., GUZZON, M. R. A., GALLISTL, C. (2020). Residues of legacy organochlorine pesticides and DDT metabolites in highly consumed fish from the polluted Guanabara Bay, Brazil: distribution and assessment of human health risk. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **55**, 30–41.

FLORENCIO-SILVA, R., *et al.* (2015). Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, 2015, Article ID 421746.
<https://doi.org/10.1155/2015/421746>

GERBER, R., SMIT, N. J., JOHAN, H. J., VUREN, V., NAKAYAMA, S. N. N., YOHANNES, Y. B., IKENAKA, Y., ISHIZUKA, M., WEPENER, V. (2016). Bioaccumulation and human health risk assessment of DDT and other organochlorine pesticides in an apex aquatic predator from a premier conservation area. *Science of the Total Environment* **550**, 522-533.

GLYNN, A. W., MICHAËLSSON, K., LIND, P. M., WOLK, A., AUNE, M., ATUMA, S., DARNERUD, P. O., MALLMIN, H. (2000). Organochlorines and bone mineral density in Swedish men from the general population. *Osteoporos International* **11**, 1036-1042.

GÓRALCZYK K, MAJCHER A. Are the civilization diseases the result of organohalogen environmental pollution? *Acta Biochim Pol.* 2019 May 24;66(2):123- 127.

HERNANDEZ, C. J., & MAJESKA, R. J. (2018). Epigenetic regulation of bone cell differentiation and bone disease. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 204.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00204>

IRIS - Integrated Risk Information System. p,p'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT); CASRN 50-29-3. National Center for Environmental Assessment. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. p1-16, 2002.

JALILI, C., KAZEMI, M.; TAHERI, E.; et al. Exposure to heavy metals and the risk of osteopenia or osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis International*, v. 31, n. 9, p. 1671-1682, 2020.

JAWAID, A.; JEHLE, K.; MANSUY, I. M. Impact of Parental Exposure on Offspring Health in Humans. *Trends in Genetics*, v. 37, n. 4, p. 1–16, 2020.

KALLIORA C, MAMOULAKIS C, VASILOPOULOS E, STAMATIADES GA, KALAFATI L, BAROUNI R, KARAKOUSHI T, ABDOLLAHI M, TSATSAKIS A.

(2018). Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities. *Toxicology and Applied Pharmacology* **346**, 58-75.

KARASIK, D., & KIEL, D. P. (2012). Genetics of the musculoskeletal system: A pleiotropic approach. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(4), 629–638. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1549>

KLAASSEN, C. D. (2013) Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 8^a Ed. New York. McGraw-Hill Education.

KUBOTA, T.; MIYAKE, K.; HARIYA, N.; MOCHIZUKI, K. Understanding the epigenetics of neurodevelopmental disorders and DOHaD. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2015.

LAPEHN, S.; PAQUETTE, A. The Placental Epigenome as a Molecular Link Between Prenatal Exposures and Fetal Health Outcomes Through the DOHaD Hypothesis. *Current Environmental Health Reports*, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 490-501, 2022.

LAPPALAINEN, T.; GREALLY, J. M. Associating cellular epigenetic models with human phenotypes. *Nature Reviews Genetics*, v. 18, n. 7, p. 441–451, 2017.

LEDGERTON, D.; HORNER, K.; DEVLIN, H.; WORTHINGTON, H.. Panoramic mandibular index as a radiomorphometric tool: an assessment of precision.

Dentomaxillofacial Radiology, v. 26, n. 2, p. 95-100, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9442624/>

LI, Y., WU, D., & ZHANG, X. (2024). Epigenetic regulation of osteogenic differentiation by environmental cues and signaling pathways: Current insights and therapeutic implications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 35(4), 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2024.03.001>

LIU, R. H. Componentes promotores de saúde de frutas e vegetais na dieta. *Advances in Nutrition*, v. 4, n. 3, p. 384S-392S, 2013.

MAMANE, A. et al. Occupational exposure to pesticides and respiratory health. *Eur Respir Rev.* v. 24, n. 136, p. 306-319, jun. 2015.

MANSOURI, A., CREGUT, M., ABBES, C., DURANT, M., LANDOULSI, A., THOUAND, G. (2017) The Environmental Issues of DDT Pollution and Bioremediation: a multidisciplinary review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **181**, 309-339.

MALCOM, A. J., & VALCARCEL, C. (2023). Microbiota and bone health: Exploring the gut-skeletal axis in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 19(2), 80–95. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00738-x>

MARIE, P. J. (2013). Bone cell biology and regulation of bone remodeling. *Bone*, 47(2), 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.02.021>

MARTIN, M. T. et al. Profiling the reproductive toxicity of chemicals from multigeneration studies in the toxicity reference database. *Toxicological Sciences*, v. 110, n. 1, p. 181–190, 2009.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, E., ESPÍN, S., BARBAR, F., LAMBERTUCCI, S. A. GÓMEZ RAMÍREZ, P., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J. (2017) Contaminants in the southern tip of South America: Analysis of organochlorine compounds in feathers of avian scavengers from Argentinean Patagonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **115**, 83-92.

MARTOS, S. N.; TANG, W.; WANG, Z. Elusive inheritance: Transgenerational effects and epigenetic inheritance in human environmental disease. v. 118, n. 1–2, p. 44–54, 2016.

MAROUANI, N., HALLEGUE, D., SAKLY, M., BENKHALIFA, M., RHOUMA, K. B., TEBOURBI, O. (2017). Involvement of oxidative stress in the mechanism of p,p'-DDT induced nephrotoxicity in adult rats. *General Physiology And Biophysics* **36**, 309-320.

MAROUANI, N., HALLEGUE, D., SAKLY, M., BENKHALIFA, M., RHOUMA, K. B., TEBOURBI, O. (2017). p,p'-DDT induces testicular oxidative stress-induced apoptosis in adult rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* **15**, 1–10.

MIGLIACCIO, V., MIGLIACCIO, V., SCUDIERO, R., SICA, R., LIONETTI, L., PUTTI, R. (2019). Oxidative stress and mitochondrial uncoupling protein 2 expression in hepatic steatosis induced by exposure to xenobiotic DDE and high fat diet in male Wistar rats. *PLoS ONE* **14**, 1–24.

Organização das nações unidas. (1972). Declaração de Estocolmo sobre o Meio Ambiente Humano. In: Anais Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente Humano. Suécia, Estocolmo.

OLVERA ALVAREZ, H. A. *et al.* An Integrated Socio-Environmental Model of Health and Well-Being: a Conceptual Framework Exploring the Joint Contribution of Environmental and Social Exposures to Health and Disease Over the Life Span. *Current environmental health reports*, v. 5, n. 2, p. 233–243, 2018.

PÉREZ-MALDONADO, I. N., HERRERA, C., BATRES, L. E., GONZÁLEZAMARO, R., DÍAZ-BARRIGA, F., YÁÑEZ, L. (2005). DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells. *Environmental Research* **98** 177-184.

PESTANA, D., TEIXEIRA, D., MEIRELES, M., MARQUES, C., NORBERTO, S., SÁ, C. *et al.* (2017) Adipose tissue dysfunction as a central mechanism leading to dysmetabolic obesity triggered by chronic exposure to p,p'-DDE. *Scientific Reports* **7**, 1–16.

PIZZORNO, J., PIZZORNO, L. (2021). Environmental toxins are a major cause of bone loss. *Integr Med (Encinitas)*, 20(1):10-17.

RAGGATT, L. J., & PARTRIDGE, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103–25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>

RIGNELL-HYDBOM, A., SKERFVING, S., LUNDH, T., LINDH, C. H., ELMSTÅHL, S., BJELLERUP, P. *et al.* (2009). Exposure to cadmium and persistent organochlorine pollutants and its association with bone mineral density and markers of bone metabolism on postmenopausal women. *Environmental Research* **109**, 991-996.

ScienceDirect (2024). Environmental modulation of epigenetics in osteogenesis. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328224000322>

SINDEAUX, R., FIGUEIREDO, P. T. S., MELO, N. S. M., GUIMARÃES, A. T. B., LAZARTE, L., PEREIRA, F. B. *et al.* (2014). Fractal dimension and mandibular cortical width in normal and osteoporotic men and women. *Maturitas* **77**, 142-148.

SKVORTSOVA, K.; IOVINO, N.; BOGDANOVIĆ, O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 19, n. 12, p. 774–790, 2018.

SSEBUGERE, P., WASSWA, J., MBABAZI, J., NYANZI, S. A., KIREMIRE, B.T., MARCO, J. A. M. (2010). Organochlorine pesticides in soils from south-western Uganda. *Chemosphere*, **78**, 1250-1255.

TEODORO, M., BRIGUGLIO, G., FENGA, C., COSTAB, C. (2019). Genetic polymorphisms as determinants of pesticide toxicity: Recent advances. *Toxicology reports* **6**, 564-570.

TIMOKHINA, E. P. YAGLOV, V. V.; NAZIMOVA, S. V. Dichlorodiphenyltrichloroethane and the adrenal gland: From toxicity to endocrine disruption. *Toxics*, v. 9, n. 10, 2021.

THIOMBANE, M., PETRIK, A., BONITO, M. D., ALBANESE, S., ZUZOLO, D., CICCHELLA, D., LIMA, A., QU, C., QI, S., VIVO, B. D. (2018). Status, sources and contamination levels of organochlorine pesticide residues in urban and agricultural areas: a preliminary review in central–southern Italian soils. *Environmental Science and Pollution Research* **25**, 26361-26382.

TUSCHER, Jennifer J.; DAY, Jeremy J. Multigenerational epigenetic inheritance: One step forward, two generations back. *Neurobiology of Disease*, v. 132, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31470104/>

U.S. EPA. Provisional Peer-Reviewed Toxicity Values f p,p’-

Dichlorodiphenyldichloroethane (p,p'-DDD). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/690/R-17/006F, 2017a.

U.S. EPA. Provisional Peer-Reviewed Toxicity Values for p,p'-Dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/690/R-17/007F, 2017b.

VALL, O., GOMEZ-CULEBRAS, M., PUIG, C., RODRIGUEZ-CARRASCO, E., BALTAZAR, A. G., CANCHUCAJA, L. *et al.* (2014). Prenatal and postnatal exposure to DDT by breast milk analysis in Canary Islands. *PLoS ONE* **9**, e83831.

VARNOSFADERANY, M. N., SOFFIANIAN, A., MIRGHAFARI, N., GU, Z., AND CHU, G. (2020). Occurrence and depositional history of organochlorine pesticides in the sediments of the Zayandehrud River in the arid region of Central Iran. *Chemosphere*, **255**, 126847.

WALLIN E, RYLANDER L, JONSSON BA (2005). Exposure to CB-153 and p,p'-DDE and bone mineral density and bone metabolism markers in middleaged and elderly men and women. *Osteoporosis international* **16**, 2085-2094.

WANG, W.; ZHANG, Q.; CHENG, H.; WANG, H.; HUANG, C.; ZHANG, X.; LIU, W.; LIU, Y. Environmental toxins and their impact on bone health via epigenetic mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 20, n. 5, p. 3201, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph20053201>.

WOODROW, J.E., GIBSON, K.A., SEIBER, J.N. (2019). Pesticides and related toxicants in the atmosphere. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **247**, 147-196.

ZAIDI, M. (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nature Medicine*, 13(7), 791–801. <https://doi.org/10.1038/nm1593>

ANEXOS

Anexo 1



Autorização

O Protocolo nº 21-20 intitulado “**Avaliação dos efeitos crônicos da exposição a metabólitos do DDT (DDD e DDE) em diferentes gerações de ratos Wistar (F1 e F2)**”, sob a responsabilidade de **Ana Tereza Bittencourt Guimarães** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 20/11/2020. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	18/01/2021 a 12/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
N. de animais	08 M - 16 F = 24
Peso/idade	150-200 g - 8 semanas de vida
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da Unioeste

Cascavel, 23/11/2020

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3126/2018-GRE

NORMAS DA REVISTA

Submissions

3. Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

- The submission has not been previously published, nor is it before another journal for consideration (or an explanation has been provided in Comments to the Editor).
- The submission file is in OpenOffice, Microsoft Word, or RTF document file format.
- Where available, URLs for the references have been provided.
- The text is single-spaced; uses a 12-point font; employs italics, rather than underlining (except with URL addresses); and all illustrations, figures, and tables are placed within the text at the appropriate points, rather than at the end.
- The text adheres to the stylistic and bibliographic requirements outlined in the Author Guidelines.

4. Author Guidelines

New name: Journal of Advances in Medicine and Medical Research

ISSN: 2456-8899

Past name: British Journal of Medicine and Medical Research

ISSN: 2231-0614 (Past)

NLM ID: 101570965

Journal DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/jammr> ([Link](#))

Peer-review model: [Advanced OPEN peer review](#)

5. Index Copernicus: ICV: 97.48

Digital Archiving: [Journal Repository \(JR\)](#), LOCKSS, CLOCKSS

6. Scope

Journal of Advances in Medicine and Medical Research (ISSN: 24568899) aims to publish research papers, reviews and short communications in the areas of medicine and medical research. JAMMR will not only publish traditional full research reports, including short communications, but also this journal will publish reports/articles on all stages of the research process like study protocols, pilot studies and pre-protocols. JAMMR is novelty attracting, open minded, peerreviewed medical periodical, designed to serve as a perfectly new platform for both mainstream and new

ground shaking works as long as they are technically correct and scientifically motivated. By not excluding papers based on novelty, this journal facilitates the research and wishes to publish papers as long as they are technically correct and scientifically motivated. The journal also encourages the submission of useful reports of negative results. This is a quality controlled, OPEN peer-reviewed, open-access INTERNATIONAL journal.

This is an open-access journal which means that all content is freely available without charge to the user or his/her institution. Users are allowed to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of the articles, or use them for any other lawful purpose, without asking prior permission from the publisher or the author. This is in accordance with the BOAI definition of open access.

Subject matters include studies in clinical areas like immunology, anaesthesia, cardiovascular medicine, complementary medicine, dentistry and oral medicine, pathology, pharmacology and therapeutics, dermatology, respiratory medicine, rheumatology, drugs and medicines, ear, nose and throat/otolaryngology, emergency medicine, infectious diseases, neurology, nutrition and metabolism, obstetrics and gynaecology, endocrinology, gastroenterology, genetics, geriatric medicine, haematology, oncology, ophthalmology, paediatrics, psychiatry, radiology, renal medicine, pharmacognosy, sexual health, urology, epidemiology, ethnic studies, health policy, occupational health, medical education, legal and forensic medicine, environmental medicine and public health, medicine development and safety testing, drug legislation and safety.

Every issue will consist of a minimum of 5 papers. Each issue will be running, and all officially accepted manuscripts will be immediately published online. The state-of-the-art running issue concept gives authors the benefit of 'Zero Waiting Time' for the officially accepted manuscripts to be published. This journal is an international journal and its scope is not confined by the boundary of any country or region.

To know more about 'General Guideline for Authors' and to download paper Template. We try to follow and we also recommend authors, reviewers and editors to follow ICMJE Recommendations.

Disclaimer: As per the recommendation of different reputed indexing organizations and following the requests of researchers and editors, title of this journal has been changed. 'British Journal of Medicine and Medical Research' continued as 'Journal of Advances in Medicine and Medical Research'. This international journal has no connection with any scholarly society or association or any specific geographic location or any country (like USA, UK, Germany, etc). This is an independent journal. Legal contact address of editorial office and other offices are available in this [link](#).

General Guideline for Authors

7. Important Download links

MS word paper template ([Download here](#))

Latex paper template ([Download here](#))

MiKTeX Software ([Download here](#)). Please read the tutorial ([Click here](#)), if you want step-by-step installation guidance.

Manuscript 'Submission form' ([Download here](#))

8. Type of papers

1. Original research papers:

Papers that include original empirical data that have not been published anywhere earlier (except as an abstract). Null/negative findings and replication/refutation findings are also welcome. This type of paper normally should not exceed 25 double-spaced pages of text (including references) and should not contain more than 15 figures/tables. We advise a length of 3000-6000 words (including everything).

2. Short Research Articles:

Short Research Articles (or Research Notes) are single-finding papers (or one year experiment for agricultural papers) that can be reported with one or two illustrations (figures/tables) and lab protocols. Posters from conferences or internal meetings may be summarized as Short Research Articles (or Research Notes). In many cases, some additional detail, particularly in the methods, description of the results, and/or discussion/conclusions will be required to make sure that readers (and referees) have enough information to understand the description of the work. We advise a length of 3000-4000 words, plus 3-4 figures and/or tables, and 15-20 key references.

3. Short communications:

Short Communications are urgent communications of important preliminary results that are very original, of high interest and likely to have a significant impact on the subject area of the journal. A Short Communication needs only to demonstrate a 'proof of principle'. Authors are encouraged to submit an Original Research Paper to the journal following their Short Communication. There is no strict page limit for a Short Communication; however, we advise a length of 2500-3500 words, plus 2-3 figures and/or tables, and 15-20 key references.

4. Review papers:

These papers will not have empirical data acquired by the authors but will include discussion of papers published and data acquired in a specific area. We advise a length of 5000-9000 words, (including 50-150 references plus 3-5 figures and/or tables (if required)).

5. Minireview papers:

Minireviews are brief historical perspectives or summaries of developments in fastmoving areas covered within the scope of the journal. They must be based on published articles; they are not outlets for unpublished data. They may address any subject within the scope of the journal. The goal of the Minireviews is to provide a concise summary of a particular field in a manner understandable to all readers. We advise a length of 3000-6000 words, (including 30-70 references plus 2-3 figures and/or tables (if required)).

6. Systematic Reviews: (Mainly for bio-medical journals)

Systematic Reviews should usually be based on medical interventions or animal model studies. We recommend that authors consult the [PRISMA](#) guidelines for reporting in Systematic Reviews. Systematic Reviews should deal with a clearly formulated question and use systematic and explicit methods to identify, select, and critically assess the relevant research. We advise a length of 5000-9000 words, (including 50-150 references plus 3-5 figures and/or tables (if required)).

7. Policy Papers:

The purpose of the policy paper is to provide a comprehensive and persuasive argument justifying the policy recommendations presented in the paper, and therefore to act as a decision-making tool and a call to action for the target audience. We advise a length of 3000-4000 words, plus 3-4 figures and/or tables, and 15-20 key references.

8. Commentaries / Opinion Articles:

An opinion-based article on a topical issue of broad interest which is intended to engender discussion. We advise a length of 2500-3500 words, plus 2-3 figures and/or tables, and 15-20 key references.

9. Data Notes

Data Notes are brief descriptions of scientific datasets that include details of why and how the data were created; they do not include any analyses or conclusions. 10. Study Protocols and pre-protocols: (Mainly for bio-medical journals)

This journal welcome protocols for any study design, including observational studies and systematic reviews. All protocols for randomised clinical trials must be registered and follow the [CONSORT](#) guidelines; ethical approval for the study must have been already granted.

Study pre-protocols (i.e. discussing provisional study designs) may also be submitted and will be clearly labelled as such when published. Study protocols for pilot and feasibility studies may also be considered.

11. Method Articles:

These articles describe a new experimental or computational method, test or procedure, and should have been well tested. This includes new study methods, substantive modifications to existing methods or innovative applications of existing methods to new models or scientific questions.

We also welcome new technical tools that facilitate the design or performance of experiments and data analysis such as software and laboratory devices, or of new technologies to assist medical treatment such as drug delivery devices. We advise a length of 3000-4000 words, plus 3-4 figures and/or tables, and 15-20 key references.

12. Data Articles (Mainly for bio-medical journals):

A dataset (or set of datasets) together with the associated methods/protocol used to create the data. No analysis of the data, results or conclusions should be included.

13. Case reports / Case studies (Mainly for bio-medical journals):

Case reports describe patient cases which are of particular interest due to their novelty and their potential message for clinical practice. While there are several types of case reports, originality and clinical implications constitute the main virtues by which case reports are judged. (Ref: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677298>). Case studies are an invaluable record of the clinical practices of a profession. While case studies cannot provide specific guidance for the management of successive patients, they are a record of clinical interactions which help us to frame questions for more rigorously designed clinical studies. Case studies also provide valuable teaching material, demonstrating both classical and unusual presentations which may confront the practitioner. (Ref: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2597880/>). Abstract (not more than 250 words) of the Case reports should have the following sections: Aims, Presentation of Case, Discussion and Conclusion. Only Case Reports have word limits: Papers should not exceed 2000 words, 20 references or 5 figures.

14. Clinical Practice Articles (Mainly for bio-medical journals):

A short article relating to a specific clinical problem or scenario that discusses issues relating to patient management and treatment pathways using an evidence-based approach. Clinical Practice Articles include case series (i.e. group or series of case reports involving patients who were given similar treatment), but should not be based on a single case (see Case Reports).

15. Grey literature government reports:

A special section of the journal will be dedicated to the publication of (extended) abstracts of "grey literature government reports". Many governmental research institutes in Europe/world are confronted with the problem that their very good scientific reports are produced directly for governmental sponsors. Results are typically presented in reports, which are published on an institute's website only. However, scientists like to publish their work in the scientific arena, albeit that there may be little, if any, funding to support writing of the results in a scientific paper. Whereas the reports may be of very high scientific quality, they are not readily disseminated to the scientific world because they are not identified by normal literature attending systems. This then leads to very good scientific work being unnoticed by a wider audience, possible re-duplication of the work in other countries, a loss of resources, and hence to a slower progression of science. Therefore, this journal offers to publish good governmental reports in this peerreviewed scientific journal via an abstract of the report. As such, this journal will publish (extended) abstracts of governmental reports (in English language only following a regular peer review system. Scientific excellence, open access and English language are the only prerequisites. Upon scientific acceptance of the work, the extended abstract will contain the title of the work, the authors as well as a hyperlink to the original full scientific report. In this way the scientific reports will be opened to a worldwide scientific audience and authoring scientists will get the results of their work disseminated in the scientific arena.

16. Abstracts of scientific meetings:

Abstracts of oral presentations and posters (within the scope of the journal) can be published in discussion with the academic editors. Standardised abstracts (prepared in accordance with journal guidelines) need to be in English language and will be peerreviewed prior to publication. It is recommended to contact the editor before submitting abstracts of a scientific meeting. Normally a collection of the abstracts (minimum 10 abstracts) will be published in a special issue. Abstracts are not considered for regular issues of the journal. Publication of 'collection of abstracts of a conference, symposia, etc' requires a guest editorial board. Normally the 'Review committee / Screening committee' of the conference will form the guest editorial board. List of the guest editors also will be published in the special issue.

17. Letter to the Editor:

A letter to the editor provides a means of communication between the author of an article and the reader of a journal, allowing continued dialog about journal content to take place. Although not original research per se, a letter may provide new insight, make corrections, offer alternate theories, or request clarification about content printed in the journal. Letters to the Editor are considered for publication (subject to editing and abridgment) provided they do not contain material that has been submitted or published elsewhere. Letters in reference to a Journal article must not exceed 600 words (excluding references). Letters not related to a Journal article must not exceed 600 words (excluding references). A letter can have no more than eight references and one figure or table. A letter can be signed by no more than four authors. Financial associations or other possible conflicts of interest must be disclosed. This type of article will be fully peerreviewed. [Publication charge](#) will be also applicable.

Reference and more information:

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647072>
2. <http://www.nejm.org/page/author-center/letter-submission>
3. <http://www.sciencemag.org/site/misc/editor.xhtml>

18. Scholarly Book Review:

The scholarly book review is considered by some to be a form of academic writing that serves to describe and critically evaluate the content, quality, meaning, and significance of a book. A well-constructed book review can provide a thoughtful perspective and will be appreciated. Scholarly Book Review should be within 2000 words. Scholarly Book Review must have to be systematic and structured and proper references (2-6 numbers) should be cited during the review. Scholarly Book Review must be avoided to advertise the book. Normal peer review process will be followed to ensure the academic quality of such book review. Only academically important and critical review of books will be considered for publication. There will be restrictions on numbers of such articles to be published per year.

For more information please refer below-mentioned resources:

1. [How to Write a Scholarly Book Review for Publication in a Peer-Reviewed Journal](#)
2. [How to Publish a Book Review](#)
3. <http://www.journals.uchicago.edu/journals/jop/book-reviews>
4. [Book Review articles: The New England Journal of Medicine](#)

9. Submission

Online submission of manuscripts is strongly recommended. Please submit your article through [Subcentral](#). Manuscripts can also be submitted as an email attachment to the editorial office at submission@journalajrnh.com. After submission, a manuscript number will be communicated to the corresponding author within 48 hours.

For submission related problems or all other correspondence, please contact the editorial office at submission@journalajrnh.com

10. Peer-review process

To know more about Peer review process and General Editorial Policies. Please see [here](#)

11. Manuscript structure

The manuscript should be written in English with a simple layout. The text should be prepared in single column format. Bold face, italics, subscripts, superscripts etc. can be used.

The text, excluding the abstract, if required, can be divided into numbered sections with brief headings. Starting from introduction with section 1. subsections should be numbered (for example 2.1 (then 2.1.1, 2.1.2, 2.2, etc.), up to three levels. (*Note:*

1. Case Reports should follow the structure of Abstract, Introduction, Presentation of Case, Discussion, Conclusion, Acknowledgements, Competing Interests, Authors' Contributions, Consent (where applicable), Ethical approval (where applicable), and References plus figures and/or tables. Abstract (not more than 250 words) of the Case

reports should have the following sections: Aims, Presentation of Case, Discussion and Conclusion. Only Case Reports have word limits: Papers should not exceed 2000 words, 20 references or 5 figures. Other

Type of papers have no word limits.

2. Review papers may have different headings of the sections and are exempted from following these suggestions.

3. Research Papers and Short Notes should follow the structure of Abstract, Introduction, Methodology, Results and Discussion, Conclusion, Acknowledgements, Competing Interests, Authors' Contributions, Consent (where applicable), Ethical approval (where applicable), and References plus figures and/or tables.)

Artificial intelligence These guidelines cover acceptable uses of generative AI technologies such as Large Language Models (ChatGPT, COPILOT, etc) and text-to-image generators in the writing or editing of manuscripts.

12. AI use by authors

Authors should not list a generative AI technology as a co-author or author of any submitted manuscript. Generative AI technologies cannot be held accountable for all aspects of a manuscript and consequently do not meet the criteria required for authorship.

If the author of a submitted manuscript has used written or visual content produced by or edited using a generative AI technology, this use must follow publication guidelines and policies. Specifically, the author is responsible for checking the factual accuracy of any content created by the generative AI technology. This includes, but is not limited to, any quotes, citations or references. Figures produced by or edited using a generative AI technology must be checked to ensure they accurately reflect the data presented in the manuscript. Authors must also check that any written or visual content produced by or edited using a generative AI technology is free from plagiarism.

If the author of a submitted manuscript has used written or visual content produced by or edited using a generative AI technology, such use must be acknowledged in the acknowledgements section of the manuscript and the methods section if applicable. This explanation must list the name, version, model, and source of the generative AI technology. We encourage authors to upload all input prompts provided to a generative AI technology and outputs received from a generative AI technology in the supplementary files for the manuscript.

13. Brief guidelines Title Page

The title page should contain a brief title, name(s) of author(s) and their affiliations. The title should be without any abbreviations and it should enlighten the contents of the paper. All affiliations should be provided with a lower-case superscript letter just after the author's name and in front of the appropriate address.

The name of the corresponding author should be indicated along with telephone and fax numbers (with country and area code) along with full postal address and e-mail address.

14. Abstract

The abstract should be concise and informative. It should not exceed 300 words in length. It should briefly describe the purpose of the work, techniques and methods used, major findings with important data and conclusions. Different subsections, as given below, should be used. No references should be cited in this part. Generally nonstandard abbreviations should not be used, if necessary they should be clearly defined in the abstract, at first use.

SAMPLE ABSTRACT:

Aims: Here clearly write the aims of this study. **Sample:** To correlate platelet count, splenic index (SI), platelet count/spleen diameter ratio and portal-systemic venous collaterals with the presence of esophageal varices in advanced liver disease to validate other screening parameters. **Study design:** Mention the design of the study here.

Place and Duration of Study: **Sample:** Department of Medicine (Medical Unit IV) and Department of Radiology, Services Institute of Medical Sciences (SIMS),

Services Hospital Lahore, between June 2009 and July 2010. **Methodology:** Please write main points of the research methodology applied. **Sample:** We included 63 patients (40 men, 23 women; age range 18-75 years) with liver cirrhosis and portal hypertension, with or without the medical history of gastrointestinal bleeding. Clinical as well as hematological examination (platelet count) and ultrasonography (gray as well as color Doppler scale including splenic index and splenorenal/pancreaticoduodenal collaterals) was done besides upper GI endoscopy for esophageal varices. Platelet count/spleen diameter ratio was also calculated.

Results: Kindly make sure to include relevant statistics here, such as sample sizes, response rates, P-values or Confidence Intervals. Do not just say "there were differences between the groups". **sample:** Out of 63 patients, 36 patients with small varices (F1/F2) and 27 with larger (F3) varices were detected on endoscope. Significant increase in mean splenic index from low (86.7 +/- 27.4) to high (94.7 +/- 27.7) grade varices was documented. Opposite trend was found with platelets (120.2 +/- 63.5 to 69.8 +/- 36.1) and platelets/ splenic diameter ratio (1676.7 to 824.6) declining significantly. Logistic regression showed splenic collaterals and platelets are significantly but negatively associated with esophageal varices grades.

Conclusion: Non-invasive independent predictors for screening esophageal varices may decrease medical as well as financial burden, hence improving the management of cirrhotic patients. These predictors, however, need further work to validate reliability.

15. Keywords

Immediately after the abstract, about 4-8 keywords should be given. Use of abbreviations should be avoided, only standard abbreviations, well known in the established area may be used, if appropriate. These keywords will be used for indexing.

16. Abbreviations

Non-standard abbreviations should be listed and full form of each abbreviation should be given in parentheses at first use in the text.

17. Introduction

Provide a factual background, clearly defined problem, proposed solution, a brief literature survey and the scope and justification of the work done.

18. Material and methods

Give adequate information to allow the experiment to be reproduced. Already published methods should be mentioned with references. Significant modifications of published methods and new methods should be described in detail. This section will include subsections. Tables & figures should be placed inside the text. Tables and figures should be presented as per their appearance in the text. It is suggested that the discussion about the tables and figures should appear in the text before the appearance of the respective tables and figures. No tables or figures should be given without discussion or reference inside the text.

Tables should be explanatory enough to be understandable without any text reference. Double spacing should be maintained throughout the table, including table headings and footnotes. Table headings should be placed above the table. Footnotes should be placed below the table with superscript lowercase letters.

Each figure should have a caption. The caption should be concise and typed separately, not on the figure area. Figures should be self-explanatory. Information presented in the figure should not be repeated in the table. All symbols and abbreviations used in the illustrations should be defined clearly. Figure legends should be given below the figures.

Some guidelines for Medical papers:

Randomized controlled trials should follow the CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) guidelines (<http://www.consort-statement.org>). Case reports, case series, cross-sectional and other observational studies should follow the STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) guidelines (<http://www.strobe-statement.org>). If the detailed methods are explicitly stated in the manuscript for single case studies, STROBE may be avoided.

Authors producing systematic reviews and meta-analyses should follow the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines (<http://www.prisma-statement.org>).

19. Results & Discussion

Results should be clearly described in a concise manner. Results for different parameters should be described under subheadings or in separate paragraph. Table or figure numbers should be mentioned in parentheses for better understanding.

The discussion should not repeat the results, but provide detailed interpretation of data. This should interpret the significance of the findings of the work. Citations should be given in support of the findings. The results and discussion part can also be described as separate, if appropriate.

20. Tables & Figures

Tables & figures should be placed inside the text. Tables and figures should be presented as per their appearance in the text. It is suggested that the discussion about the tables and figures should appear in the text before the appearance of the respective tables and figures. No tables or figures should be given without discussion or reference inside the text.

Tables should be explanatory enough to be understandable without any text reference. Double spacing should be maintained throughout the table, including table headings and footnotes. Table headings should be placed above the table. Footnotes should be placed below the table with superscript lowercase letters.

Each figure should have a caption. The caption should be concise and typed separately, not on the figure area. Figures should be self-explanatory. Information presented in the figure should not be repeated in the table. All symbols and

abbreviations used in the illustrations should be defined clearly. Figure legends should be given below the figures. Guideline for Reporting *P* values: *P* is always italicized and capitalized.

i) Correct expression: ($P = .05$). Wrong Expression: ($P < .05$), unless $P < .001$. ii) The *P* value should be expressed to 2 digits whether or not it is significant.

If $P < .01$, it should be expressed to 3 digits. iii) When rounding, 3 digits is acceptable if rounding would change the significance of a value (eg, $P = .049$ rounded to $.05$). iv) Expressing *P* to more than 3 significant digits does not add useful information since precise *P* values with extreme results are sensitive to biases or departures from the statistical model.

v) Reporting actual *P* values avoids this problem of interpretation. *P* values should not be listed as not significant (NS) since, for meta-analysis, the actual values are important and not providing exact *P* values is a form of incomplete reporting. vi) Do not use 0 before the decimal point for statistical values *P*, alpha, and beta because they cannot equal 1.

Conclusions

This should briefly state the major findings of the study.

21. Acknowledgments

A brief acknowledgment section may be given after the conclusion section just before the references. The acknowledgments of people who provided assistance in manuscript preparation, funding for research, etc. should be listed in this section. All sources of funding should be declared as an acknowledgment. Authors should declare the role of the funding agency, if any, in the study design, collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

22. Competing Interests

Declaration of competing interest is compulsory. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If no such declaration has been made by the authors, reserves to assume and write this sentence: "Authors have declared that no competing interests exist."

23. AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Authors may use the following wording for this section: " 'Author A' designed the study, performed the statistical analysis, wrote the protocol, and wrote the first draft of the manuscript. 'Author B' and 'Author C' managed the analyses of the study. 'Author C' managed the literature searches..... All authors read and approved the final manuscript."

24. CONSENT (WHERE EVER APPLICABLE)

No manuscripts will be peer-reviewed if a statement of patient consent is not presented during submission (wherever applicable).

This section is compulsory for medical journals. Other journals may require this section if found suitable. It should provide a statement to confirm that the patient has given their informed consent for the case report to be published. Journal editorial office may ask the copies of the consent documentation at any time.

Authors may use a form from their own institution or [Patient Consent Form 1.0](#). It is preferable that authors should send this form along with the submission. But if already not sent during submission, we may request to see a copy at any stages of pre and post publication.

If the person described in the case report has died, then consent for publication must be collected from their next of kin. If the individual described in the case report is a minor, or unable to provide consent, then consent must be sought from their parents or legal guardians.

Authors may use the following wording for this section: "All authors declare that 'written informed consent was obtained from the patient (or other approved parties) for publication of this case report and accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editorial office/Chief Editor/Editorial Board members of this journal."

25. ETHICAL APPROVAL (WHERE EVER APPLICABLE)

This section is compulsory for medical journals. Other journals may require this section if found suitable. If human subjects are involved, informed consent, protection of privacy, and other human rights are further criteria against which the manuscript will be judged. It should provide a statement to confirm that the authors have obtained all necessary ethical approval from suitable Institutional or State or National or International Committee. This confirms either that this study is not against the public interest, or that the release of information is allowed by legislation.

All manuscripts which deal with animal subjects must be approved by an Institutional Review Board (IRB), Ethical Committee, or an Animal Utilization Study Committee. , and this statement, and approval number, must accompany the submission. If required, the author should be ready to submit a scanned copy of the IRB or Ethical Committee Approval at any stage of publication (Pre or post publication stage). The manuscript should contain information about any postoperative care and pain management for the animals.

For manuscripts involving animal experiments, Authors may use the following wording for this section "All authors hereby declare that "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85-23, revised 1985) were followed, as well as specific national laws where applicable. All experiments have been examined and approved by the appropriate ethics committee"

All manuscripts which deal with the study of human subjects must be accompanied by Institutional Review Board (IRB) or Ethical Committee Approval, or the national or regional equivalent. The name of the Board or Committee giving approval and the study number assigned must accompany the submission. If required, the author should be ready to submit a scanned copy of the IRB or Ethical Committee Approval at any stage of publication (Pre or post publication stage).

For manuscripts involving human experiments, Authors may use the following wording for this section: "All authors hereby declare that all experiments have been examined and approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki."

26. Reference style

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. Every reference referred in the text must also present in the reference list and vice versa. In the text, citations should be indicated as **(Author name, year)**.

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Articles submitted for publication, unpublished findings and personal communications should not be included in the reference list but may be mentioned in the text (e.g., T Nelson, Purdue University, USA, Unpublished results or personal communication). Avoid citing a "personal communication" unless it provides essential information not available from a public source, in which case the name of the person and date of communication should be cited in parentheses in the text. For scientific articles, obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Unpublished result which has been accepted for publication in any journal should be cited as "in press". Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases (Link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

27. Recommendation to fight against Reference manipulation or Citation of improper References

As per our policy to protect the journal from the problem of reference manipulation or citation of improper references, we strongly discourage grouping of more than 5 references after a single sentence. Authors are requested to mention maximum of 5 references after a single sentence within the manuscript. This will also improve the readability of the published paper.

Note: This journal will follow this new reference style, effective from 01 Jan, 2025.

All references should follow the following style: **Reference to a journal:**

For Published paper:

1. Hilly, M., Adams, M. L., & Nelson, S. C. (2002). A study of digit fusion in the mouse embryo. *Clinical and Experimental Allergy*, 32(4), 489-498.

Note: List the first six authors followed by et al.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is encouraged. (if available). Note: Authors are also encouraged to add other database's unique identifier (like PUBMED ID).

For Accepted, unpublished papers.

Same as above, but "In press" appears instead of the page numbers.

1. Saha, M., Adams, M. L., & Nelson, S. C. (2009). Review of digit fusion in the mouse embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 49(3), (In press). Note: List the first six authors followed by et al. Note: Use of a DOI number is encouraged (if available).

Note: Authors are also encouraged to add other database's unique identifier (like PUBMED ID).

27.1 For Articles not
in English

Forneau, E., & Bovet, D. (1933). Recherches sur l'action sympatholytique d'un nouveau dérivé du dioxane. *Archives Internationales de Pharmacodynamie*, 46, 178-191. **Reference to a book:**

27.2 Personal author(s)

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Moore, P. K. (2003). *Pharmacology* (5th ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone.

27.3 Editor(s) or compiler(s) as authors

Beers, M. H., Porter, R. S., Jones, T. V., Kaplan, J. L., & Berkwitz, M. (Eds.). (2006). The Merck manual of diagnosis and therapy (18th ed.). Merck Research Laboratories.

27.4 Authored chapter in edited publication

Glennon, R. A., & Dukat, M. (2002). Serotonin receptors and drugs affecting serotonergic neurotransmission. In D. A. Williams & T. L. Lemke (Eds.), Foye's principles of medicinal chemistry (5th ed., pp. xx-xx). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. **Reference to Web-resource or Electronic articles.**

Hugo, J. T., & Mondal, S. C. (2006). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis: A conceptual framework. Global Health, 16,

4. <https://doi.org/10.1186/1744-8603-1-14>

Anonymous. (2006). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis:

A conceptual framework. Globalization and Health, 16(4). <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>

28. Reference to Organization as author

Diabetes Prevention Program Research Group. (2009). A study of digit fusion in the mouse embryo. Journal of Embryology and Experimental Morphology, 49(2), 259–276.

29. Nomenclature and Units

Internationally accepted rules and the international system of units (SI) should be used. If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

For biological nomenclature, the conventions of the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature* should be followed.

Scientific names of all biological creatures (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be mentioned in parentheses at first use of their English term.

Chemical nomenclature, as laid down in the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

30. Math formulae

All equations referred to in the text should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. Meaning of all symbols should be given immediately after the equation at first use. Instead of root signs, fractional powers should be used. Subscripts and superscripts should be presented clearly. Variables should be presented in italics. Greek letters and non-Roman symbols should be described in the margin at their first use. To avoid any misunderstanding zero (0) and the letter O, and one (1) and the letter I should be clearly differentiated.

For simple fractions use of the solidus (/) instead of a horizontal line is recommended. Levels of statistical significance such as: *P <0.05, **P <0.01 and ***P <0.001 do not require any further explanation.

31. Copyright and License

1. Submission of a manuscript clearly indicates that: the study has not been published before or is not under consideration for publication elsewhere (except as an abstract or as part of a published lecture or academic thesis); its publication is permitted by all authors and after accepted for publication it will not be submitted for publication anywhere else, in English or in any other language, without the written approval of the copyright holder.
2. The journal may consider manuscripts that are translations of articles originally published in another language. In this case, the consent of the journal in which the article was originally published must be obtained and the fact that the article has already been published must be made clear on submission and stated in the abstract. It is compulsory for the authors to ensure that no material submitted as part of a manuscript infringes existing copyrights or the rights of a third party.
3. Copyright of any open-access article, published in this journal, is retained by the author(s).
4. Submission of a manuscript clearly indicates that authors grant this journal a license to publish the article and identify the journal as the original publisher. The submitting author (corresponding author) is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors and after the publication of the paper author-dispute-related issues will not be entertained. It is also the corresponding authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution.
5. Authors also grant any third party the right to use the article freely as long as its integrity is maintained and its original authors, citation details, and publisher are identified.
6. The Creative Commons Attribution License 4.0 formalizes these and other terms and conditions of publishing articles.
7. Where an author is prevented from being the copyright holder (for instance in the case of US government employees or those of Commonwealth governments), minor variations may be required. In such cases, the copyright line and license statement in individual articles will be adjusted, for example to state '© 2016 Crown copyright'.
8. Authors requiring a variation of this type should inform the journal during or immediately after submission of their article. Changes to the copyright line cannot be made after the publication of an article.
9. Authors should mandatorily ensure that submission of a manuscript to this journal would result in no breach of contract or of confidence or of commitment given to secrecy.

32. Proofs

A PDF file of proof will be sent to the corresponding author as an e-mail attachment. Authors will be asked to check any typographical or minor clerical errors in the manuscript at this stage. No other major alteration in the manuscript is allowed. After publication authors can freely access the full text of the article as well as can download and print the PDF file.

33. Fees and Charges

Authors are requested to visit [Publication Charge](#), FAQ and Help, Authors section and [Institutional membership section](#) to have information about Publication Charge and discounts.

34. Submission Checklist

Kindly ensure to send the following 2 files during submission. 1. Manuscript formatted as per paper template ([MS Word Template](#) and [Latex Template](#))
2. Manuscript Submission form (See [link](#))

Privacy Statement

35. Publication Ethics and Malpractice Statement

This journal follows the guidelines of the 'Committee on Publication Ethics' (COPE) (<https://publicationethics.org>). This journal follows the 'Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors' and the 'Code of Conduct for Journal Publishers' as mentioned in COPE website (<https://publicationethics.org/guidance/Guidelines> and <https://publicationethics.org/guidance/Flowcharts>).

35.1 1. Duties of Editors

1.1 Fair play

The submitted manuscripts are assessed for their academic content regardless of the authors' race, gender, sexual orientation, religious belief, ethnic origin, citizenship or political philosophy. Decisions to edit and publish are not controlled by government regulations or by any other entity outside the journal itself.

1.2 Confidentiality

Editors and editorial staff will not reveal any details about a submitted manuscript to anyone, other than the corresponding author, reviewers, prospective reviewers, other editorial advisors and the publisher, as necessary.

1.3 Disclosure and conflicts of interest

Unpublished materials contained in a submitted manuscript must not be used in the own research of an Editor without explicit written permission of the author(s). Privileged information or ideas that editors receive as a result of manuscript handling would be kept confidential and not used for their personal benefit. Editors will refuse to act as an editor for manuscripts in which they have conflicts of interest arising from financial, competitive, collaborative or other relationships/association with any of the authors, companies or organisations linked to the papers; instead, they will ask another board member to handle the manuscript.

1.4 Publication decisions

The journal's editor is responsible for determining which of the submitted papers should be published. The editor may be guided by the policy of the Editorial Board of

the journal and limited by such legal provisions as are then in place in respect of libel, violation of copyright and plagiarism. When making this decision, the handling editor can consult with other editors or reviewers.

35.2 2. Duties of Peer Reviewers

2.1 Contribution to editorial decisions

Peer review helps the editor to make editorial decisions and, through editorial correspondence with the author, can also assist the author in the refinement of the manuscript.

2.2 Promptness

Any invited referee who feels unqualified to review the research contained in a manuscript or who knows that its timely review would be extremely difficult/impossible should immediately inform the editors and refuse the invitation to review so that alternative reviewers can be contacted.

2.3 Confidentiality

Manuscripts submitted for review must be considered as confidential documents. Except where approved by the editor, they must not be shown or shared with others. This policy is also applicable for the invited reviewers who refuse the invitation to review.

2.4 Standards of objectivity

Reviews should be carried out objectively, and suggestions should be clearly articulated with supporting reasons, so that authors may use them to refine the manuscript. Personal criticism of the author(s) is inappropriate and must be avoided. Referees should clearly express their opinions with suitable and reasonable supporting arguments.

2.5 Acknowledgement of sources

Reviewers should also identify relevant published work which the authors have not cited. Every statement that is an observation, derivation or argument that has been published in previous publications should be followed by the relevant citation. The reviewer should also inform the editors of any apparent resemblance or similarity between the manuscript under consideration and any other manuscripts (published or unpublished) about which they have personal knowledge.

2.6 Disclosure and conflict of interest

Privileged information or concepts gained through peer review must be held confidential and not used for personal gain. Reviewers must not consider reviewing manuscripts in which they have a conflict of interest as a result of a financial, competitive, collaborative or other relationship or association with any of the authors, companies or organisations involved in the submission.

35.3 3. Duties of authors

3.1 Reporting standards

Authors documenting the findings of the original research should include an accurate description of the work done and an objective analysis of its importance. The underlying data should be correctly reflected in the manuscript. The paper should contain sufficient detail and references to allow others to reproduce the work. Fraudulent or intentionally false claims represent unethical behaviour and are not permissible.

3.2 Originality and Plagiarism

The authors should ensure that they have written completely original works, and if the authors have used the works and/or the words of others, that they have been properly referenced or quoted. Plagiarism takes several types, from "passing" another's paper as the author's own, to copying or paraphrasing large sections of another's paper (without attribution) to claiming findings from studies by others. Plagiarism, in all its forms, constitutes an unethical behaviour in publishing and is unacceptable.

3.3 Multiple, redundant or concurrent publication

In general, the author should not publish papers presenting fundamentally the same study in more than one journal or primary publication. At the same time, the submission of the same manuscript to more than one journal constitutes an unethical publishing activity and is unacceptable.

3.4 Acknowledgement of sources

Proper acknowledgement of the work of others must always be provided. Authors should also cite publications that have been influential in determining the nature of the reported work.

3.5 Authorship of the manuscript

Authorship should be restricted to those who have made an important contribution to the conception, design, execution, or interpretation of the reported study. All those who have made major contributions should be listed as coauthors. Where there are others who have participated in certain substantive aspects of the research project, they should be named in an Acknowledgement section. The corresponding author should ensure that all appropriate co-authors (according to the above definition) and no inappropriate coauthors are included in the author list of the manuscript and that all co-authors have seen and approved the final version of the paper and have agreed to its submission for publication.

3.6 Hazards and human or animal subjects

If the work involves chemicals, procedures or equipment that have any unusual hazards inherent in their use, the authors must clearly identify these in the manuscript.

3.7 Disclosure and conflicts of interest

All authors must disclose in their manuscript any financial or other substantive conflicts of interest that might be construed to influence the results or their interpretation in the manuscript. All sources of financial support for the project should be disclosed.

3.8 Peer review

Authors are obliged to participate in the peer-review process and cooperate fully by responding promptly to editors' requests for raw data, clarifications, and proof of ethics approval, patient consents and copyright permissions. In the case of a first decision of "revisions necessary", authors should respond to the reviewers' comments systematically, point by point, and in a timely manner, revising and resubmitting their manuscript to the journal by the deadline given.

3.9 Data access and retention

Authors may be asked to provide the raw data of their study together with the manuscript for editorial review.

3.10 Fundamental errors in published works

When authors discover significant errors or inaccuracies in their own published work, it is their obligation to promptly notify the journal's editors or publisher and cooperate with them to either correct the paper in the form of an erratum or to retract the paper. If the editors or publisher learns from a third party that a published work contains a significant error or inaccuracy, then it is the authors' obligation to promptly correct or retract the paper or provide evidence to the journal editors of the correctness of the paper.

35.4 4. Duties of the Publisher

4.1 Handling of unethical publishing behaviour

In cases of alleged or proven scientific misconduct, fraudulent publication or plagiarism the publisher, in close collaboration with the editor, will take all appropriate measures to clarify the situation and to amend the article in question. This includes the prompt publication of an erratum or, in the most severe cases, the complete retraction of the affected work. The publisher, together with the editors, shall take reasonable steps to identify and prevent the publication of papers where research misconduct has occurred, and under no circumstances encourage such misconduct or knowingly allow such misconduct to take place.

4.2 Access to journal content

The publisher is committed to the permanent availability and preservation of scholarly research and ensures accessibility by maintaining its own digital archive.

4.3 Fair play

The Publisher and the Journal do not discriminate on the basis of age, colour, religion, creed, disability, marital status, veteran status, national origin, race, gender, genetic predisposition or carrier status, or sexual orientation in its publishing programs, services and activities.

35.5 5. Copyright and License

5.1 Submission of a manuscript clearly indicates that: the study has not been published before or is not under consideration for publication elsewhere (except as an abstract or as part of a published lecture or academic thesis); its publication is permitted by all authors and after accepted for publication it will not be submitted for publication anywhere else, in English or in any other language, without the written approval of the copyright holder. Authors should mandatorily ensure that submission of a manuscript to this journal would result in no breach of contract or of confidence or of commitment given to secrecy. The journal may consider manuscripts that are translations of articles originally published in another language. In this case, the consent of the journal in which the article was originally published must be obtained and the fact that the article has already been published must be made clear on submission and stated in the abstract. It is compulsory for the authors to ensure that no material submitted as part of a manuscript infringes existing copyrights or the rights of a third party.

5.2 Submission of a manuscript clearly indicates that authors grant this journal a **license** to publish the article and identify itself as the original publisher. The submitting author (corresponding author) is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors and after the publication of the paper author-dispute related issues will not be entertained. It is also the corresponding authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution.

5.3 Copyright on any open access article published in this journal is retained by the author(s). The [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) formalizes these and other terms and conditions of publishing articles. Authors also grant any third party the right to use the article freely as long as its integrity is maintained and its original authors, citation details and publisher are identified. This journal gives permission to authors to post

final accepted versions or published articles on third party repositories, provided citation details and publisher are identified

5.4 Where an author is prevented from being the copyright holder (for instance in the case of US government employees or those of Commonwealth governments), minor variations may be required. In such cases, the copyright line and license statement in individual articles will be adjusted, for example to state '© 2016 Crown copyright'. Authors requiring a variation of this type should inform the journal during or immediately after submission of their article. Changes to the copyright line cannot be made after publication of an article.

Anexo 3

Comprovante de submissão do artigo

ENC: 2025/JAMMR/132746 : PRE- AND POSTNATAL EXPOSURE TO THE ORGANOCHLORINE RESIDUES DDT AND ITS DERIVATIVES DOES NOT ALTER MANDIBULAR BONE DENSITY IN RATS

 Resumo por Copilot

✕

Tel (45)3220-3257

De: Managing Editor (Submission) <submission@peerreviewcentral.com>

Enviado: segunda-feira, 10 de março de 2025 07:42

Para: Sandra Lucinei Balbo <slbalbo@hotmail.com>

Assunto: Re: 2025/JAMMR/132746 : PRE- AND POSTNATAL EXPOSURE TO THE ORGANOCHLORINE RESIDUES DDT AND ITS DERIVATIVES DOES NOT ALTER MANDIBULAR BONE DENSITY IN RATS

----- Forwarded message -----

From: **Managing Editor8** <editor.8@sdjpublisher.org>

Date: Sat, Mar 8, 2025 at 1:24 PM

Subject: Re: 2025/JAMMR/132746 : PRE- AND POSTNATAL EXPOSURE TO THE ORGANOCHLORINE RESIDUES DDT AND ITS DERIVATIVES DOES NOT ALTER MANDIBULAR BONE DENSITY IN RATS

To: Sandra Lucinei Balbo <slbalbo@hotmail.com>

2025/JAMMR/132746 : Acknowledgement of manuscript submission

Dear Dr. Sandra Lucinei Balbo,