



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

**FERNANDO CÉZAR CARDOSO MAIA**

**DANO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO À EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA  
INALATÓRIA E ORAL AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Presidente Prudente - SP  
2020

**FERNANDO CÉZAR CARDOSO MAIA**

**DANO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO À EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA  
INALATÓRIA E ORAL AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora:  
Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai

636.089  
M177d

Maia, Fernando César Cardoso.

Dano cardiovascular associado à exposição subcrônica inalatória e oral ao herbicida glifosato / Fernando César Cardoso Maia. – Presidente Prudente, 2020.

47f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai

1. Aterosclerose. 2. Toxicidade. 3. Glifosato. I. Título.

**FERNANDO CÉZAR CARDOSO MAIA**

**DANO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO À EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA  
INALATÓRIA E ORAL AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 18 de setembro de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Gisele Alborghetti Nai  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

---

Profa. Dra. Patrícia Monteiro Seraphim  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP  
Presidente Prudente - SP

---

Prof. Dr. Rômulo Cesar Arnal Bonini  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente - SP

## DEDICATÓRIA

*“À **minha esposa Thereza** pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente pelo incansável estímulo para que tudo fosse possível.*

*Sem você nenhuma conquista valeria a pena”.*

*“Aos **meus pais David (in memoriam) e Nadyr**, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência”.*

*“Aos **trabalhadores do planeta terra** - pessoas que com o suor do próprio corpo se preocupam diariamente em contribuir pelo bem-estar de todos os povos”.*

## AGRADECIMENTOS

*“À **Professora Gisele**, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade, e pelo seu Dom no ensino da Ciência, inibindo sempre o alarde em prol da simplicidade e eficiência; minha admiração também pelo seu sorriso largo e sinceridade de todos os dias e intermináveis discussões”.*

*“Aos **Professores do Programa de Mestrado em Ciência Animal da Unoeste**, sempre atenciosos e preocupados com a qualidade do ensino e funcionamento do curso. Parabênizo-lhes pelo grau de compromisso e dedicação. Meus agradecimentos por tantas contribuições”.*

*“A **Deus** por me presentear com a vida de meus filhos Fernando e Veridiana, minha nora Valéria e meu genro Marcelo, tesouros mais valiosos que poderíamos desejar nesta e noutras encarnações”.*

*“Cada um vai colher o que plantou, somado aos agrotóxicos das atitudes alheias”*  
**Emerson Cristofer**

## RESUMO

### Dano cardiovascular associado à exposição subcrônica inalatória e oral ao herbicida glifosato

**Introdução:** Milhões de agricultores sofrem envenenamento e morte em países em desenvolvimento, e a exposição ocupacional e o suicídio tornam a toxicidade ao glifosato uma preocupação mundial. **Objetivo:** Avaliar os efeitos cardiovasculares da exposição subcrônica por via oral e inalatória ao herbicida glifosato em ratos. **Material e métodos:** Foram utilizados 80 ratos Wistar albinos divididos em 8 grupos (5 machos e 5 fêmeas/grupo): IC: nebulização com solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%; OC: ração nebulizada com NaCl 0,9%; LGI: nebulização com  $3,71 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) de glifosato; LGO: ração nebulizada com  $3,71 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato; MGI: nebulização com  $6,19 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato; MGO: ração nebulizada com  $6,19 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato; HGI: nebulização com  $9,28 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato; HGO: ração nebulizada com  $9,28 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato. Após exposição de 75 dias, os animais foram eutanasiados e coletaram-se fragmentos da aorta e o coração para análise histopatológica. **Resultados:** Estrias de colesterol foram observadas na maioria dos animais expostos ao glifosato e foram mais incidentes nos ratos machos, independente da via de exposição ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença nas medidas da espessura e na densidade de colágeno dos ventrículos direito e esquerdo em nenhum dos grupos avaliados ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** Nosso estudo sugere que o glifosato apresenta potencial aterogênico, independente da via de exposição. Assim, é necessário cuidado na aplicação de glifosato em lavouras e jardins, uma vez que seu uso pode causar risco à saúde.

**Palavras-chave:** glifosato, toxicidade, aorta, aterosclerose, modelo experimental.



## ABSTRACT

### Cardiovascular damage associated with inhalation and oral subchronic exposure to glyphosate herbicide

**Introduction:** Millions of farmers suffer poisoning and death in developing countries, and occupational exposure and suicide make glyphosate toxicity a worldwide concern. Objective: To assess the cardiovascular effects of subchronic oral and inhalation exposure to the herbicide glyphosate in rats. **Material and methods:** 80 albino Wistar rats were used, divided into 8 groups (5 males and 5 females / group): CI: nebulization with sodium chloride solution (NaCl); OC: nebulized feed with NaCl; LGI: nebulization with  $3.71 \times 10^{-3}$  grams of active ingredient per hectare (g.i.a / ha) of glyphosate; LGO: nebulized feed with  $3.71 \times 10^{-3}$  g.i.a / ha of glyphosate; MGI: nebulization with  $6.19 \times 10^{-3}$  g.i.a / ha of glyphosate; MGO: nebulized feed with  $6.19 \times 10^{-3}$  g.i.a / ha of glyphosate; HGI: nebulization with  $9.28 \times 10^{-3}$  g.i.a / ha of glyphosate; HGO: nebulized feed with  $9.28 \times 10^{-3}$  g.i.a / ha of glyphosate. After 75 days of exposure, the animals were euthanized and fragments of the aorta and the heart were collected for histopathological analysis. **Results:** Cholesterol streaks were observed in most animals exposed to glyphosate and were more prevalent in male rats, regardless of the route of exposure ( $p < 0.05$ ). There was no difference in the thickness and collagen density measurements of the right and left ventricles in any of the groups evaluated ( $p > 0.05$ ). **Conclusion:** Our study suggests that glyphosate has atherogenic potential, regardless of the route of exposure. Thus, it is necessary to be careful when applying glyphosate to crops and gardens, since its use may cause health risks.

**Key words:** glyphosate, toxicity, aorta, atherosclerosis, experimental model.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Caixa utilizada para nebulização dos animais.....	17
Figura 2 -	A – Fotomicroscopia do ventrículo esquerdo – animal macho do Grupo Controle inalatório (Tricrômio de Masson, 400x). B – Imagem binarizada. C – <i>Box-counting</i> da análise da dimensão fractal.....	19
Figura 3 -	Porcentagem de casos com estrias de colesterol por grupo de estudo e sexo dos animais (n=79) .....	21
Figura 4 -	Estria de colesterol representada por presença de células espumosas subendoteliais (seta) – macho do grupo LGI (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x) .....	21
Figura 5-	Fotomicroscopia do coração. A – Fibras musculares cardíacas com arranjo normal. Hematoxilina-eosina, aumento de 100x. B – Detalhe mostrando cardiomiócitos e arteríola (asterisco) sem alterações (Animal macho do Grupo HGI). Hematoxilina-eosina, aumento de 400x .....	22
Figura 6 -	A – Média da medida da espessura do ventrículo esquerdo (em pixel), segundo o grupo de estudo e sexo dos animais (n=79). $p = 0,533$ . B - Média da medida da espessura do ventrículo direito (em pixel), segundo o grupo de estudo e sexo dos animais (n=79). $p=0,977$ .....	23
Figura 7 -	A - Dimensão fractal do ventrículo esquerdo, segundo o grupo de estudo e sexo dos animais (n=79). $p= 0,583$ . B - Dimensão fractal do ventrículo direito, segundo o grupo de estudo e sexo dos animais (n=79). $p= 0,224$ .....	24

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Frequência de estrias de colesterol observada nos animais por grupo de estudo, independente do sexo os animais (n=79) .....	20
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO .....</b>	<b>12</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>31</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE) .....</b>	<b>31</b>
	<b>ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA A QUAL O ARTIGO SERÁ SUBMETIDO .....</b>	<b>32</b>

## 1 ARTIGO

**DANO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO À TOXICIDADE SUBCRÔNICA  
INALATÓRIA E ORAL AO HERBICIDA GLIFOSATO EM RATOS WISTAR**

Fernando César Cardoso Maia <sup>a</sup>, Rebecca Andrade Porto <sup>b</sup>, Letícia Rocha Magalhães <sup>b</sup>, Pedro Henrique Nahas Chagas <sup>c</sup>, Gisele Alborghetti Nai <sup>d,\*</sup>.

<sup>a</sup> MD, student of the Graduate Program in Animal Science, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

<sup>b</sup>Graduate student, Faculty of Medicine, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

<sup>c</sup> MD, Faculty of Medicine, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

<sup>d</sup> PhD, MD, professor of the Department of Pathology and the Graduate Program in Animal Science, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

\*Correspondence: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br

Conflito de interesses: Os autores declararam que não existe nenhum conflito de interesse.

Contribuição dos autores: FCCM realizou a análise e interpretação dos dados e redigiu o manuscrito; RAP: realizou os experimentos e realizou a análise dos dados; LRM e PHNC: realizou os experimentos; GAN: fez contribuições substanciais para o desenho da pesquisa, realizou análise histológica e revisou criticamente o conteúdo intelectual do manuscrito. Todos os autores contribuíram para a versão final do manuscrito.

**HIGHLIGHTS**

- O glifosato tem potencial aterogênico independente da via e da dose de exposição.
- A aterosclerose associada à exposição ao glifosato é mais incidente em machos.
- É necessário cuidado no uso de glifosato em lavouras e jardins devido ao risco de dano cardiovascular.

## RESUMO

*Introdução:* Milhões de agricultores sofrem envenenamento e morte em países em desenvolvimento, e a exposição ocupacional torna a toxicidade ao glifosato uma preocupação mundial. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos cardiovasculares da exposição subcrônica por via oral e inalatória ao herbicida glifosato em ratos.

*Métodos:* Foram utilizados 80 ratos Wistar albinos divididos em 8 grupos (5 machos e 5 fêmeas/grupo): IC: nebulização com solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%; OC: ração nebulizada com NaCl a 0,9%; LGI: nebulização com  $3,71 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) de glifosato; LGO: ração nebulizada com  $3,71 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato; MGI: nebulização com  $6,19 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato; MGO: ração nebulizada com  $6,19 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato; HGI: nebulização com  $9,28 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato; HGO: ração nebulizada com  $9,28 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato. Após exposição de 75 dias, os animais foram eutanasiados e coletaram-se fragmentos da aorta e o coração para análise histopatológica.

*Resultados:* Estrias de colesterol foram observadas na maioria dos animais expostos ao glifosato e foram mais incidentes nos ratos machos, independente da via de exposição ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença nas medidas da espessura e na densidade de colágeno dos ventrículos direito e esquerdo em nenhum dos grupos avaliados ( $p > 0,05$ ).

*Conclusões:* Nosso estudo sugere que a exposição crônica ao glifosato apresenta potencial aterogênico, principalmente em machos, independente da via de exposição.

*Palavras-chave:* glifosato, toxicidade, aorta, aterosclerose, modelo experimental.

---

*Abreviações:* IC: grupo controle inalatório; OC: grupo controle oral; LGI: grupo baixa concentração inalatório; LGO: grupo baixa concentração oral; MGI: grupo média concentração inalatório; MGO: grupo média concentração oral; HGI: grupo alta concentração inalatório; HGO: grupo alta concentração oral; g.i.a/ha: gramas de ingrediente ativo por hectare; EPA: Environmental Protection Agency.

## 1. Introdução

O glifosato foi descoberto em 1950 e é comercializado como herbicida a partir de 1974 [1]. Desde então, o uso de glifosato no setor agrícola (em lavouras de algodão, milho, soja e canola) aumentou 300 vezes até 2014, enquanto que o uso não agrícola (em residências e parques urbanos) aumentou 43 vezes no mesmo período [2].

Após 1996, uma ou duas aplicações de glifosato já eram eficazes em quase todas as terras cultivadas com sementes geneticamente modificadas, aumentando assim a área de terra tratada com este herbicida. Porém, isto levou ao desenvolvimento de plantas daninhas resistentes ao glifosato, acarretando em aumento tanto do número de aplicações de glifosato quanto da quantidade deste [3].

O glifosato é moderadamente persistente em águas superficiais e subterrâneas, o que aumenta sua diversidade de possíveis rotas de exposição animal e humana. Os níveis de glifosato e seus resíduos em uma variedade de alimentos estão aumentando, por isso avaliações de risco alimentar devem ser realizadas. Devido ao seu uso para controle de ervas daninhas em jardins domésticos e praças urbanas, sua exposição não ocupacional também merece atenção [2].

Durante anos, o glifosato foi considerado um dos herbicidas com menos efeitos tóxicos crônicos para mamíferos, sendo sua toxicidade mais associada a dano renal e hepático e possibilidade de ser cancerígeno para seres humanos [2]. Alguns estudos experimentais [4] e com seres humanos [5] mostraram alterações eletrofisiológicas cardíacas, tais como bloqueios de condução e arritmias associadas à exposição ao glifosato.

O glifosato é um dos produtos mais utilizados para pulverização de lavouras no mundo. A ação cardiovascular do glifosato ainda não está totalmente estabelecida, principalmente no que tange a alterações histopatológicas que este herbicida possa causar no sistema cardiovascular.

A hipótese do nosso estudo foi que a exposição subcrônica ao glifosato pode causar dano cardiovascular e que este dano pode ser dependente da via de exposição e do sexo dos animais.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar histopatologicamente os possíveis efeitos cardiovasculares da exposição subcrônica por via oral e inalatória ao



herbicida glifosato em ratos simulando a exposição ambiental com três doses relevantes da exposição humana.

## 2. Métodos

### 2.1. Protocolo animal

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade do Oeste Paulista (Protocolo n° 5221) (Anexo A).

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 80 ratos Wistar albinos, machos e fêmeas, adultos, com peso entre 200-250g, alocados em gaiolas plásticas, a temperatura média de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07h00 às 19h00 (período claro) e 19h00 às 07h00 (período escuro).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (sendo, machos: n=5 e fêmeas: n=5 / grupo):

- IC - controle inalatório: nebulização com solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%;
- OC - controle oral: ração nebulizada com solução de NaCl a 0,9%;
- LGI - baixa concentração inalatório: nebulização com  $3,71 \times 10^{-3}$  gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha) de glifosato;
- LGO - baixa concentração oral: ração nebulizada com  $3,71 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato;
- MGI - média concentração inalatório: nebulização com  $6,19 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato;
- MGO - média concentração oral: ração nebulizada com  $6,19 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato;
- HGI - alta concentração inalatório: nebulização com  $9,28 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato;
- HGO - alta concentração oral: ração nebulizada com  $9,28 \times 10^{-3}$  g.i.a/ha de glifosato.

## 2.2. Protocolo de exposição ao herbicida glifosato

A exposição ao herbicida glifosato foi feita com Glifosato [N-(phosphonomethyl) glycine] (Roundup Original DI, Monsanto, São Paulo, Brasil), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – sob o nº 00513, concentração: Sal de Di-amônio de Glifosato 445 g/L (370 g/L equivalente ácido). Foram utilizadas três diferentes doses, segundo a bula do fabricante, utilizadas para o controle de diferentes ervas daninhas em diferentes lavouras (capim azedo, capim amargoso e capim braquiária). As doses foram adaptadas à área da caixa para simular a exposição ambiental [6].

Tanto os animais quanto a ração foram nebulizados por aproximadamente 15 minutos, utilizando-se duas caixas (32x24x32cm), cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star<sup>®</sup> (Soniclear Ind. Com. Imp. e Exp. Ltda., São Paulo, Brasil) (Figura 1). Para proceder a nebulização, o glifosato foi diluído em 10 ml de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% [6].



**Fig. 1.** Caixa utilizada para nebulização dos animais.

Os animais expostos por via inalatória foram nebulizados durante cinco dias consecutivos na semana. A nebulização da ração dos animais expostos por via oral foi realizada um dia antes de ser ofertada e trocada a cada dois dias. Foi ofertado 600g de ração por caixa e o residual foi pesado a cada troca.

Todos os animais foram expostos durante 75 dias. Após este período, os animais foram eutanasiados com Tiopental sódico (Syntec, EUA), na dose de 100mg/kg, via intraperitoneal [7].

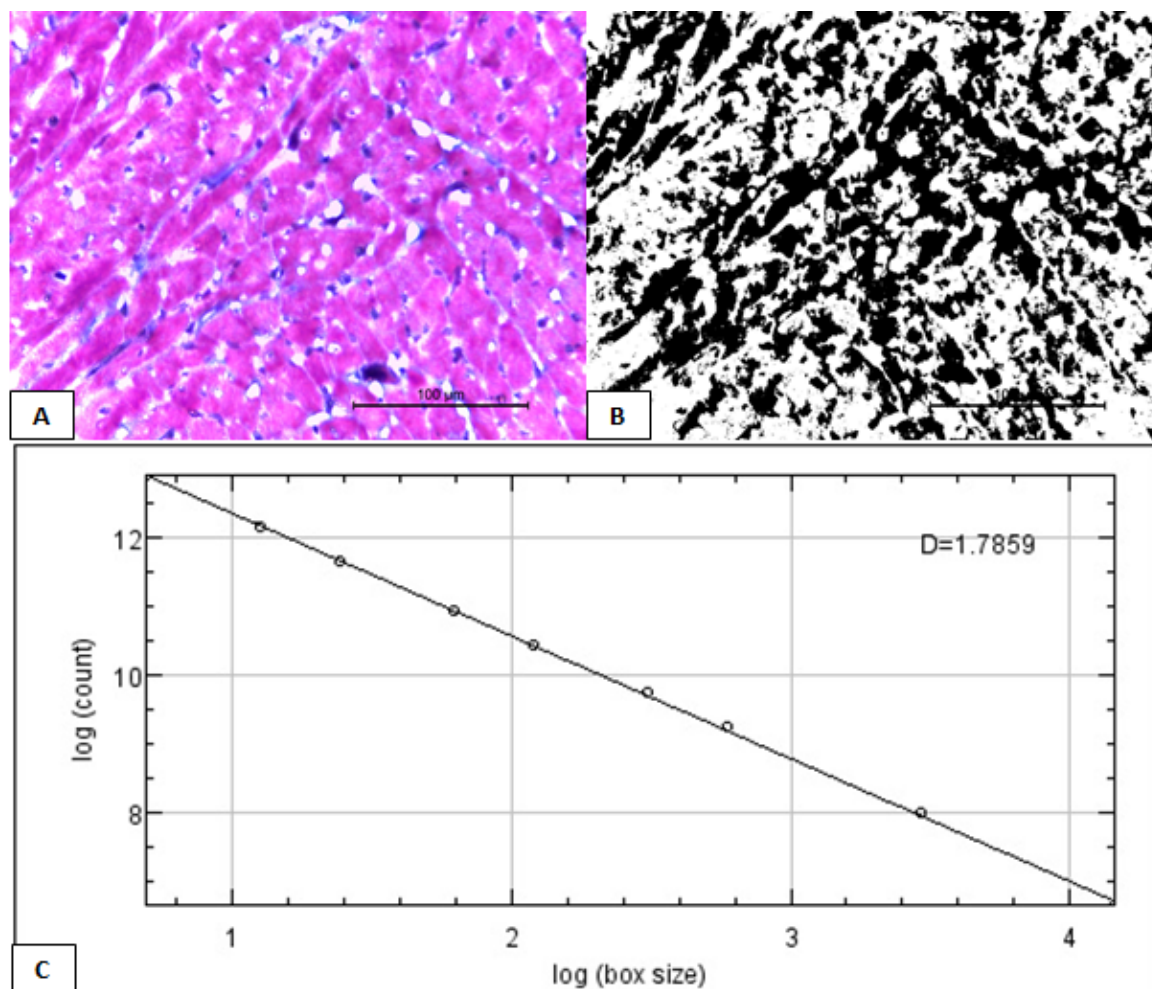
### 2.3. Análise histopatológica

Após a eutanásia, foi retirado a aorta e o coração de cada animal. Os fragmentos retirados foram fixados em formol tamponado a 10% (Cinética Indústria Química, São Paulo, Brasil) durante 24 horas.

Metade do coração após corte longitudinal e três fragmentos da aorta após corte transversal (terço proximal, médio e distal), fixados em formol, foram submetidos a processamento histológico habitual, com inclusão em parafina (Dinâmica Reagentes Analíticos, São Paulo, Brasil). Cortes seriados de 5 $\mu$  foram obtidos por micrótomo LEICA RM2265 (Leica Biosystems Nussoch GmbH, Alemanha) e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) (Dolles, São Paulo, Brasil). Os cortes de coração também foram corados por tricrômio de Masson (Merck KgaA, Darmstadt Alemanha) para quantificação das fibras colágenas.

A análise histopatológica foi cega e realizada por um único observador experiente, utilizando-se microscópio óptico comum (NIKON Labophot, Japão). O parâmetro avaliado na aorta foi a presença de aterosclerose, graduada em: ausente, estrias de gordura, leve, moderada, e severa [8]. No coração, foram avaliados os seguintes parâmetros: presença e grau de infiltrado inflamatório intersticial e tipo de célula inflamatório presente; presença e grau de congestão tecidual; alterações nas fibras musculares (hipertrofia, atrofia, apoptose, necrose, esclerose); alterações vasculares (arteriosclerose e aterosclerose); lesões neoplásicas benignas e malignas [8]. Além disso, foi realizada a medida da espessura da parede livre do ventrículo direito e da parede livre do ventrículo esquerdo, em duas áreas de cada parede utilizando-se o software Image J<sup>®</sup>, do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (*National Institutes of Health* - NIH), disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) [9].

O depósito de colágeno no coração foi avaliado por análise de dimensão fractal. As imagens originais coradas por tricrômio de Masson foram capturadas pelo fotomicroscópio Leica (Leica Microsystems, Suíça). A análise da dimensão fractal foi realizada pelo método de *box-counting*, ficando a dimensão fractal calculada entre 0 e 2, não distinguindo texturas diferentes (adaptado de Pacagnelli et al. [10]) (Figura 2).



**Fig. 2.** A – Fotomicroscopia do ventrículo esquerdo – animal macho do Grupo Controle inalatório (Tricrômio de Masson, 400x). B – Imagem binarizada. C – *Box-counting* da análise da dimensão fractal.

#### 2.4. Análise estatística

Para comparação da presença de estria de colesterol entre os grupos foi utilizado o teste de Razão de Verossimilhança. Para comparar a espessura e a dimensão fractal entre os grupos, foi utilizado o Teste de Kruskal-Wallis e o de Mann-Whitney (Inalatório x Oral), pois as variáveis não apresentaram normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene). Quando detectada a diferença entre os grupos, foi aplicado o teste de Dunn para as comparações múltiplas.

As análises estatísticas foram feitas com o IBM SPSS Statistics V. 23. Os testes foram realizados com 5% de significância.

### 3. Resultados

Uma fêmea do grupo OC foi a óbito durante o estudo devido à infecção do conduto auditivo.

A quantidade de ingesta da ração não diferiu entre grupos avaliados ( $p = 0,703$ ).

#### 3.1. Aorta

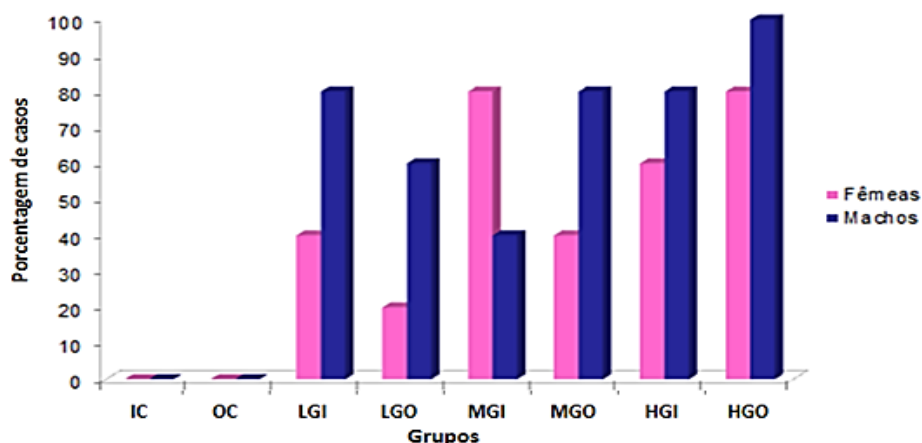
A única alteração observada na aorta foi estria de colesterol. Somente os animais expostos ao glifosato apresentaram estrias de colesterol ( $p < 0,05$ ), independente da via de exposição (oral e inalatória) ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1). Os ratos machos apresentaram maior incidência de estrias de colesterol do que as fêmeas ( $p = 0,041$ ), exceto para o grupo MGI (Figuras 3 e 4).

**Tabela 1**

Frequência de estrias de colesterol observada nos animais por grupo de estudo, independente do sexo os animais ( $n=79$ ).

<b>Grupos</b>	<b>Estrias de gordura</b>	<b>Grupos</b>	<b>Estrias de gordura</b>
<b>IC</b>	0/10 (0%) <sup>a</sup>	<b>OC</b>	0/9 (0%) <sup>a</sup>
<b>LGI</b>	6/10 (60%) <sup>b</sup>	<b>LGO</b>	4/10 (40%) <sup>b</sup>
<b>MGI</b>	6/10 (60%) <sup>b</sup>	<b>MGO</b>	6/10 (60%) <sup>b,c</sup>
<b>HGI</b>	7/10 (70%) <sup>b</sup>	<b>HGO</b>	9/10 (90%) <sup>c</sup>

Grupos: IC: controle inalatório; OC: controle oral; LGI: baixa concentração inalatório; LGO: baixa concentração oral; MGI: média concentração inalatório; MGO: média concentração oral; HGI: alta concentração inalatório; HGO: alta concentração oral. Letras minúsculas comparam os grupos ao mesmo tempo e na mesma coluna. Letras minúsculas diferentes:  $p < 0,05$ .



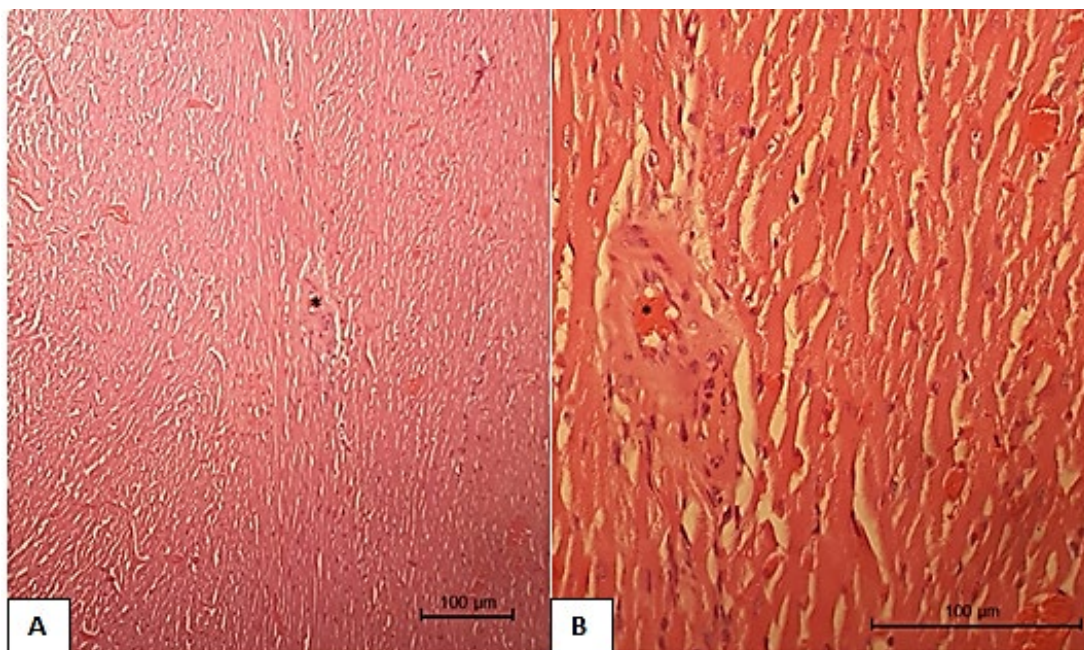
**Fig. 3.** Porcentagem de casos com estrias de colesterol por grupo de estudo e sexo dos animais (n=79). Grupos: IC: controle inalatório; OC: controle oral; LGI: baixa concentração inalatório; LGO: baixa concentração oral; MGI: média concentração inalatório; MGO: média concentração oral; HGI: alta concentração inalatório; HGO: alta concentração oral.



**Fig. 4.** Estria de colesterol representada por presença de células espumosas subendoteliais (seta) – macho do grupo LGI (Hematoxilina-eosina, aumento de 200x).

### 3.1. Coração

Não foram observados infiltrado inflamatório intersticial, congestão tecidual, alterações nas fibras musculares, arteriosclerose ou lesões neoplásicas benignas e malignas no coração de nenhum dos animais avaliados (Figura 5).



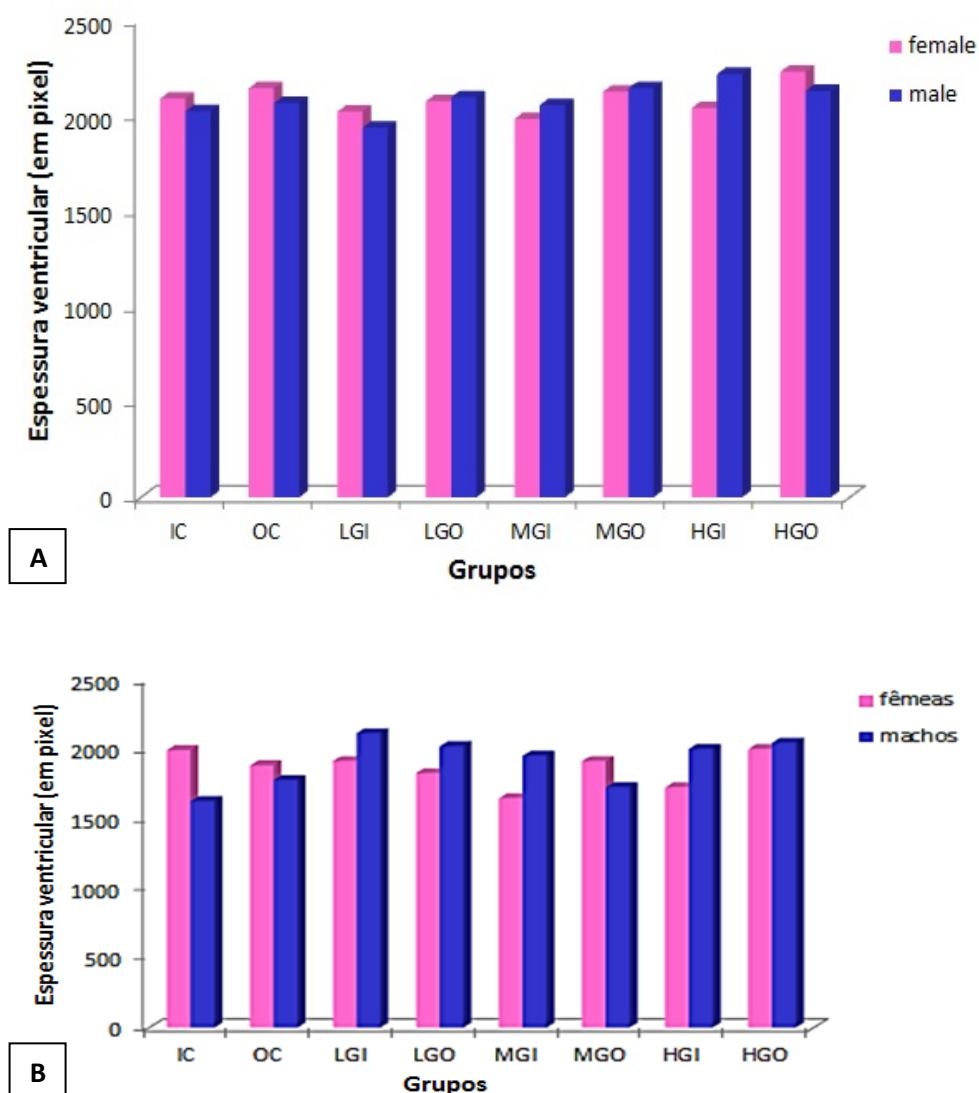
**Fig. 5.** Fotomicroscopia do coração. A – Fibras musculares cardíacas com arranjo normal (Hematoxilina-eosina, aumento de 100x). B – Detalhe mostrando cardiomiócitos e arteríola (asterisco) sem alterações (Hematoxilina-eosina, aumento de 400x) (Animal macho do Grupo IC).

### 3.1.1. Medida da espessura dos ventrículos

Não houve diferença significativa nas medidas da espessura do ventrículo esquerdo entre os postos em relação à dose ( $p = 0,533$ ) e sexo dos animais ( $p > 0,05$ ) (Figura 6A).

Não houve diferença significativa nas medidas da espessura do ventrículo direito em nenhum dos grupos avaliados ( $p = 0,977$ ) (Figura 6B).



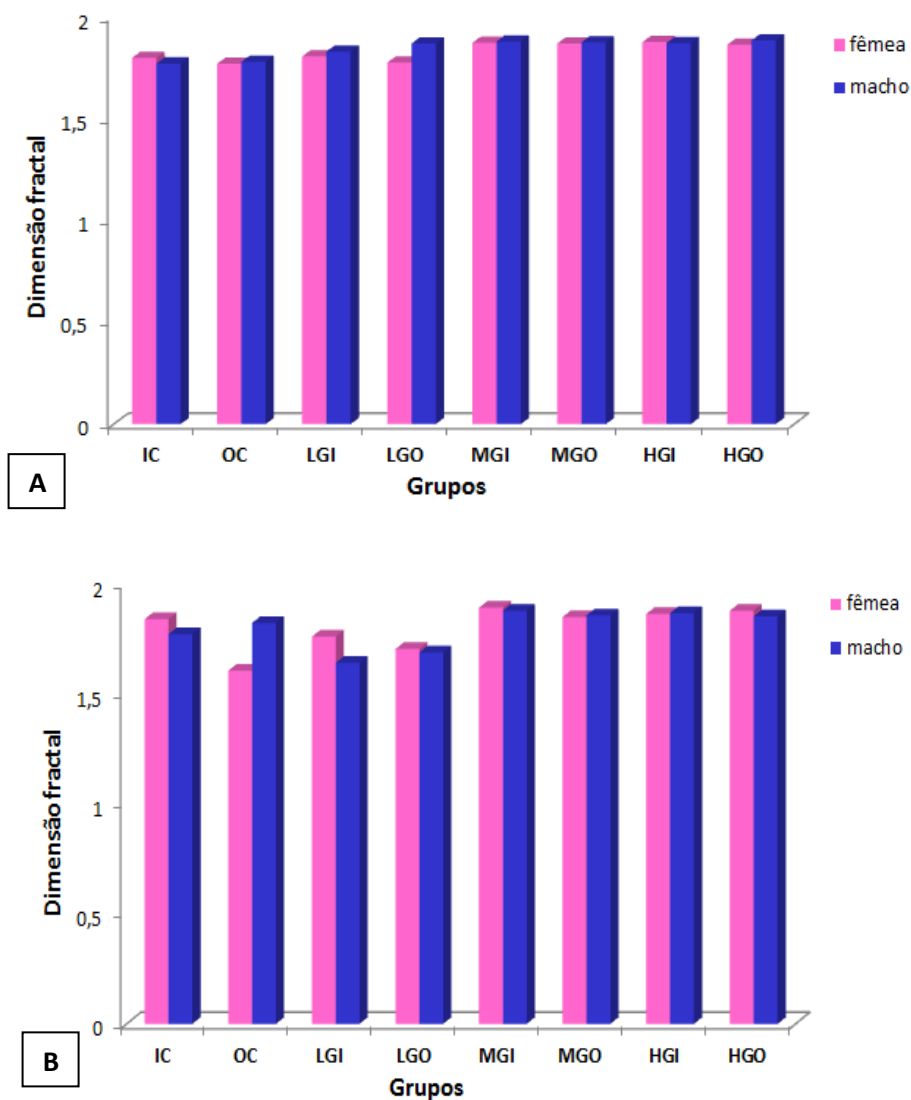


**Fig. 6.** A – Média da medida da espessura do ventrículo esquerdo (em pixel), segundo o grupo de estudo e sexo dos animais (n=79).  $p = 0,533$ . B - Média da medida da espessura do ventrículo direito (em pixel), segundo o grupo de estudo e sexo dos animais (n=79).  $p=0,977$ . Grupos: IC: controle inalatório; OC: controle oral; LGI: baixa concentração inalatório; LGO: baixa concentração oral; MGI: média concentração inalatório; MGO: média concentração oral; HGI: alta concentração inalatório; HGO: alta concentração oral.



### 3.1.2. Dimensão fractal

Não houve diferença significativa na avaliação da densidade de colágeno pela dimensão fractal dos ventrículos esquerdo ( $p= 0,583$ ) e direito ( $p= 0,224$ ) em nenhum dos grupos avaliados (Figuras 7A e 7B).



**Fig. 7.** A - Dimensão fractal do ventrículo esquerdo, segundo o grupo de estudo e sexo dos animais ( $n=79$ ).  $p= 0,583$ . B - Dimensão fractal do ventrículo direito, segundo o grupo de estudo e sexo dos animais ( $n=79$ ).  $p= 0,224$ . Grupos: IC: controle inalatório; OC: controle oral; LGI: baixa concentração inalatório; LGO: baixa concentração oral; MGI: média concentração inalatório; MGO: média concentração oral; HGI: alta concentração inalatório; HGO: alta concentração oral.

#### 4. Discussão

O glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo, não apenas em lavouras, mas também em jardins urbanos e domésticos. Este herbicida foi introduzido em meados da década de 1970. Desde então, seu uso tem aumentado gradualmente. Embora, o uso do glifosato seja permitido pelas agências governamentais reguladoras dos Estados Unidos e da Europa, ao longo dos anos têm aumentado as evidências de um efeito danoso desse herbicida para os seres humanos [11]. Nas concentrações utilizadas em nosso estudo (que simularam doses relevantes para a exposição humana) e no período de tempo avaliado, o herbicida glifosato levou a formação de estrias de colesterol na aorta, predominantemente nos machos, independente da dose do herbicida. Esta alteração foi independente da via de exposição. Não houve aumento da espessura do ventrículo esquerdo nos animais expostos ao glifosato.

A via inalatória é a principal via de exposição aos herbicidas, principalmente nas exposições ocupacionais. Porém, a exposição por via oral, tanto ocupacional quanto paraocupacional, também pode ocorrer. Estudos mostraram que o glifosato foi absorvido por cenoura e alface após o solo ter sido tratado com ele [12,13]. Assim, para exposições em humanos, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency* – EPA) estabeleceu a dose de referência crônica diária do glifosato em 1,75 miligramas por quilograma de peso corporal [14]. Por isso, não só a via inalatória, mas também a via oral foi testada em nosso estudo.

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes no corpo é chamado de estresse oxidativo. Atualmente, o estresse oxidativo está entre os assuntos mais importantes na toxicologia de pesticidas. O estresse oxidativo nas células, devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), pode danificar proteínas celulares, lipídios e DNA. A toxicidade de muitos xenobióticos está associada à produção de espécies reativas de oxigênio, os quais estão envolvidos na fisiopatologia de muitas doenças [15]. Alguns estudos mostraram associação do dano causado pelo glifosato com estresse oxidativo [16,17].

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de artérias de médio e grande calibre associada com risco cardiovascular de infarto do miocárdio, angina

instável, morte cardíaca súbita, acidente vascular cerebral e trombose periférica. A aterosclerose é a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo todo [18]. A aterogênese começa com lesão endotelial devido ao estresse oxidativo associado com fatores de risco, como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, dislipidemia, obesidade e síndrome metabólica [19]. Além destes, alguns outros fatores de risco tem sido relacionados à aterogênese, como por exemplo, exposição ao cádmio [8]. A aterogênese se inicia na infância, com acúmulo de lipídios na região subendotelial, e ao longo dos anos, a lesão vai evoluindo, constituindo a placa de ateroma [8]. A placa de ateroma bem formada é composta de células espumosas (macrófagos que fagocitaram lipídios), proteínas, músculo liso e acúmulo progressivo de cálcio [19]. No presente estudo, nós fazemos a primeira descrição de aterosclerose associada à exposição ao glifosato. Observamos uma alta incidência de formação de estrias de colesterol (a lesão inicial da aterosclerose) em todos os grupos expostos ao glifosato. Provavelmente, o mecanismo de aterogênese relacionado à exposição ao glifosato esteja associado a sua capacidade de causar estresse oxidativo nos tecidos. Nós realizamos uma exposição subcrônica ao glifosato (75 dias), por isso as lesões observadas foram apenas estrias de gordura. Para formação de uma placa de ateroma completa é necessário mais tempo de agressão endotelial, ou seja, mais tempo de exposição. Além disso, observamos uma maior incidência de estrias de colesterol nos ratos machos, o que corrobora com a literatura, onde homens apresentam maior incidência de aterosclerose do que mulheres. Acredita-se que o estrogênio seja responsável pela proteção das mulheres contra doenças cardiovasculares na pré-menopausa. Porém, o mecanismo preciso das diferenças de gênero na aterosclerose ainda é desconhecido [18].

Um estudo com ratos e coelhos mostrou que o glifosato não aumentou o risco de malformações e defeitos cardiovasculares na prole, quando os níveis de exposição foram abaixo daqueles que causaram toxicidade materna [20]. Em outro estudo com ratos e coelhos expostos ao glifosato, foram observadas alterações eletrofisiológicas cardíacas diretas, como bloqueios de condução e arritmias [4]. Em humanos, pelo menos um eletrocardiograma alterado foi detectado em 80% dos pacientes expostos ao glifosato em uma grande série retrospectiva, sendo as alterações mais frequentes, prolongamento do complexo QTc, arritmias e bloqueio atrioventricular de primeiro grau [5].

A hipertrofia cardíaca é uma resposta adaptativa a um estresse hemodinâmico, como por exemplo, hipertensão arterial e doenças valvulares, numa tentativa de diminuir a tensão da parede ventricular e melhorar o desempenho cardíaco frente à sobrecarga de trabalho [21,22]. Embora, seja uma resposta adaptativa, a hipertrofia por tempo prolongado pode aumentar o risco de morte súbita e insuficiência cardíaca [21,22]. O desenvolvimento da hipertrofia cardíaca envolve várias alterações estruturais e moleculares no tecido cardíaco [21]. Uma destas alterações é o remodelamento cardíaco, onde há depósito de colágeno entre as fibras cardíacas [22], o que contribui para a piora de função cardíaca. Em nosso estudo, não observamos um aumento na espessura do ventrículo esquerdo e direito ou na densidade do colágeno cardíaco em nenhum dos animais expostos ao glifosato, provavelmente porque a exposição foi de 75 dias, o que possivelmente não foi tempo suficiente para o desenvolvimento dessas alterações.

Mais estudos simulando a exposição ambiental e avaliando não só aspectos morfológicos, mas também avaliando o estresse oxidativo em vasos e na musculatura cardíaca deverão ser realizados para se estabelecer adequadamente os efeitos cardiovasculares devido à toxicidade do glifosato.

Nossos dados demonstram que é necessário cuidado na aplicação de glifosato em lavouras e jardins, uma vez que seu uso pode causar risco à saúde. Assim, concluímos que o glifosato apresenta potencial aterogênico, independente da via de exposição.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado por fundos de pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). Os autores agradecem aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia da UNOESTE, Carlos Alexandre Santana de Oliveira, Mariana Fonseca Motta Borges e Talita Rizo Pereira, pelo processamento histológico dos espécimes. R. A. Porto foi bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/CNPq).

### **Referências**

- [1] Duke SO, Powles SB. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 2008; 64:319-25.
- [2] Benbrook C. Trends in the use of glyphosate herbicide in the U.S. and globally. *Environ Sci Eur*. 2016; 28(1):3. doi: <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.
- [3] Heap IM. Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest Manag Sci* 2014; 70:1306-15.
- [4] Gress S, Lemoine S, Séralini G, Puddu PE. Glyphosate-Based Herbicides Potently Affect Cardiovascular System in Mammals: Review of the Literature. *Cardiovasc Toxicol* 2015; 15:117-26. doi: 10.1007/s12012-014-9282-y.
- [5] Kim YH, Lee JH, Hong CK, Cho KW, Park YH, Kim YW, et al. Heart rate-corrected QT interval predicts mortality in glyphosate-surfactant herbicide-poisoned patients. *Am J Emerg Med* 2014; 32: 203-7. doi: 10.1016/j.ajem.2013.09.025.
- [6] Mello FA, Quinallia G, Marion AL, Jorge FC, Marinelli LM, Salge AKM, et al. Evaluation of the nasal cavity mice submitted to the inhalation exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)* 2018; 51(4). doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p00-00>.
- [7] Paiva FP, Mafilli VV, Santos ACS. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. 2005. Available from: [http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha\\_manipulacao.pdf](http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_manipulacao.pdf). [Assessed 22 ago 2017].
- [8] Nai GA, Golghetto JJ, Estrella MP, Alves JA, Garcia LA. pH dependence of cadmium-contaminated drinking water on the development of cardiovascular injury in Wistar rats. *Biol Trace Elem Res*. 2015; 165(1):81-5. doi: 10.1007/s12011-014-0216-0.
- [9] Gay-Jordi G, Guash E, Benito B, Brugada J, Nattel S, Monti L, et al. Losartan prevents heart fibrosis induced by long-term intensive exercise in an animal model. *PLoS ONE* 2013; 8(2): e55427. doi: 10.1371/journal.pone.0055427.
- [10] Pacagnelli FL, Sabela AK, Mariano TB, Ozaki GA, Castoldi RC, Carmo EM, et al. Fractal dimension in quantifying experimental-pulmonary-hypertension-induced cardiac dysfunction in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2016; 107(1): 33-9. doi: 10.5935/abc.20160083.

- [11] Caiati C, Pollice P, Favale S, Lepera ME. The herbicide glyphosate and its apparently controversial effect on human health: an updated clinical perspective. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2019. doi: 10.2174/1871530319666191015191614.
- [12] Henderson AM, Gervais JA, Luukinen B, Buhl K, Stone D. Glyphosate General Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. 2010. Available from: <http://npic.orst.edu/factsheets/glyphogen.html>. [Assessed 22 ago 2017].
- [13] Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ*. 2018; 616-17:255-68. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.309.
- [14] Antoniou M, Habib MEM, Howard CV, Jennings RC, Leifert C, Nodari RO, et al. Teratogenic effects of glyphosate-based herbicides: divergence of regulatory decisions from scientific evidence *J Environ Anal Toxicol* 2012; *J Environ Anal Toxicol* S4:006. doi: 10.4172/2161-0525.S4-006.
- [15] Mansour SA, Mossa ATH. Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pestic Biochem Physiol* 2010; 96: 14-23. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.08.008>.
- [16] Bali YA, Kaikai, Ba-Mhamed S, Bennis M. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology* 2019; 415: 18-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.01.010>.
- [17] Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Maximiliano JE, et al. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ Int*. 2020; 135:105414. doi: 10.1016/j.envint.2019.105414.
- [18] Mathur P, Ostadal B, Romeo F, Mehta JL. Gender-related differences in atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2015; 29(4):319-27. doi: 10.1007/s10557-015-6596-3.
- [19] Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem* 2015; 6(3): 209-17. doi: <http://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.209>.

- [20] Kimmel GL, Kimmel CA, Williams AL, De Sesso JM. Evaluation of developmental toxicity studies of glyphosate with attention to cardiovascular development. *Crit Rev Toxicol* 2013; 43:2, 79-95. doi: 10.3109/10408444.2012.7498.
- [21] Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003; 65:45-79.
- [22] Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, Zerriouh M, Schmack B, Farag M, et al. Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis. *Med Sci Monit Basic Res*. 2016; 22:75-9. doi: 10.12659/MSMBR.900437.

## ANEXOS

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)

01/03/2019

Certificado

### UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação  
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

## Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "DANO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO A EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA INALATORIA E ORAL AO HERBICIDA GLIFOSATO", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5221 e sendo como participante(s) FERNANDA DE MARIA SERRA (discente), FERNANDO CEZAR CARDOSO MAIA (discente), PEDRO HENRIQUE NAHAS CHAGAS (discente), REBECCA ANDRADE PORTO (discente), LETICIA ROCHA MAGALHAES (discente), GISELE ALBORGHETTI NAI (orientador responsável), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ACESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APR. COM RECOMENDAÇÃO em reunião realizada em 20/02/2019.

#### MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhe: armazenamento
3761	17/05/2017	UNOESTE	NÃO	Laboratório de anatomia patológica - Bloco D - Campus I

Presidente Prudente, 1 de Março de 2019.

  
 Prof. Dr. Luiz Rodrigues Garcia Jr.  
 Coordenador Científico da CPDI

  
 Prof. Ms. Adriana Falcão de Brito  
 Coordenadora da CEUA - UNOESTE

valide este documento em [www.unoeste.br/sgp](http://www.unoeste.br/sgp) informando o código de segurança 8b458fe76c8fd09446b619f013fd602d



## ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA A QUAL O ARTIGO SERÁ SUBMETIDO



### CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

A Journal of Basic, Clinical and Applied Cardiovascular Science

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



#### DESCRIPTION

*Cardiovascular Pathology* is a bimonthly journal that presents articles on topics covering the entire spectrum of **cardiovascular disease**. The Journal's primary objective is to publish papers on disease-oriented morphology and pathogenesis from clinicians and scientists in the cardiovascular field. Subjects covered include **cardiovascular biology, prosthetic devices, molecular biology** and experimental models of cardiovascular disease.

For more information about the Society for Cardiovascular Pathology (SCVP), please visit their website at URL: <http://scvp.net>.

##### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://service.elsevier.com>

#### AUDIENCE

Cardiovascular Pathologists, Clinicians and Researchers in Cardiology, Pathologists.

#### IMPACT FACTOR

2018: 1.765 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

*Cardiovascular Pathology* is the official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology. The Journal publishes peer-reviewed articles on all aspects of cardiovascular disease, but with a particular focus on the pathology and pathogenesis of these entities. Authors are invited to submit original research articles. Brief communications, case reports with significant new findings, as well as letters to the Editors will be considered. Review articles may be invited or unsolicited submissions.

#### Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

### Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)*

*Supplemental files (where applicable)*

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
  - All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
  - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
  - A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- 
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
  - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



### Before You Begin

#### Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

#### Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of

Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### ***Declaration of interest***

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, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#). This information should be uploaded into the submission system under the "Legal" file type.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### ***Preprints***

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

### **Contributors**

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

## Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

## Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

## Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

## Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

## Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

## Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report;

and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

### ***Elsevier Researcher Academy***

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### ***Submit your article***

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/cvp/default.aspx>.

### ***Referees***

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



### **Preparation**

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

### ***Use of word processing software***

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### ***Material and methods***

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### ***Theory/calculation***

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### ***Results***

Results should be clear and concise.

#### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

## Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

## Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

## Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or

uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### ***Graphical abstract***

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Formatting of funding sources***

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

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

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

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

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



**Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

**Math formulae**

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

**Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

**Artwork****Electronic artwork***General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

*Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If you submit usable color figures with your accepted article, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print (recommended), you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Color art charges apply for the print edition: **\$300** for the first color figure and **\$50** for each additional color figure; art is reproduced in color on the Web free of charge. Duplicate higher contrast images are requested for black and white reproduction in print. Authors are encouraged to contact the Journal Manager, [s.thulasingham@elsevier.com](mailto:s.thulasingham@elsevier.com), for assistance in producing high quality black and white reproductions.

### ***Illustration services***

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### ***Tables***

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### ***References***

#### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication

date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### **Reference links**

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### **Data references**

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### **References in a special issue**

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### **Reference management software**

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/cardiovascular-pathology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### **Reference formatting**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### **Reference style**

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.  
*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### **Examples:**

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

### **Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

## Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [Science Direct](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

## Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

## Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

## Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

### **Data linking**

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### **Mendeley Data**

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### **Data statement**

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

### **Types of Manuscripts**

**Full Manuscripts:** These include original articles and reviews. The target length is 3000 - 4,000 words (12 - 16 double spaced pages). The text is accompanied by References, Figures and Tables appropriate for the subject matter. Longer submissions will be considered. Review articles may be invited or unsolicited submissions.

**Brief Communications:** The target length is 2000 words or less, with a focused selection of references, Figure(s) or Table(s) needed to convey essential information. Materials and methods may be condensed but of sufficient detail to permit evaluation by reviewers and reproduction by other workers.

**Case Reports:** Only well worked up case reports about new or interesting entities with a review of the literature will be considered. The target length is 2000 words or less, with a

focused selection of references, Figure(s) or Table(s) needed to convey essential information.

**Images in Cardiovascular Pathology:** The target length of the text is no more than 500 words with a maximum of five references and the essential Figure(s).

**Editorials and Perspectives:** Editorials and longer perspectives may be invited or unsolicited submissions. The target length is 2000 words or less, with a focused selection of references, Figure(s) or Table(s) needed to convey essential information.

**Innovative CV Pathology, Pathobiology, Interventions and Technologies:** These review articles will have the following characteristics: one article per issue or less (4-6 per year), up to 3000 - 4000 words of text plus up to approximately 25 references, and 5 major categories and many choices within each; for example:

1. Prosthetics (e.g., endovascular stents, vascular grafts, stent grafts, cardiac assist devices/artificial hearts, valves, cardiovascular biomaterials). Contributions on prosthetics have at least 3 sections: description of device, pathophysiologic principles, sequelae/complications.
2. Interventions/Surgery (e.g., PTCA, valve repair, transmyocardial laser revascularization, arrhythmia ablation, xenotransplantation, minimally-invasive surgery). Contributions on interventions/procedures have at least 3 sections: description of technology, pathophysiologic principles, sequelae/complications.
3. Pharmacologic/genetic/biologic therapeutics (e.g., pharmacogenetics, antiangiogenesis, statins, intracoronary radiation, prevention of restenosis).
4. Molecular diagnostics, genomics, proteomics, biomarkers and computational biology.
5. Other, including mechanisms of disease, novel/evolving concepts (e.g., computerized flow dynamics, blood-surface interaction, prosthetic device infection, tissue remodeling, stem cells and other biotechnology approaches, myocardial regeneration, tissue engineering, drug delivery systems, quantitation of myocardial cell size, early diagnosis of MI, assessment of cell phenotype, characterization of extracellular matrix, imaging, methods of analysis).

**Letters to the Editor:** These should be limited to 1500 words, with no more than 5 references and one Figure or Table.



### After Acceptance

#### Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only

be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.



### **Author Inquiries**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).